ISSN-0187/294X

BEB 2000

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Órgano de información de la
ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, AC

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA, AC

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).

Vol. 19 No. 3 SEPTIEMBRE 2000

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

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES

SOCORRO CONCEPCIÓN DURÁN VARGAS
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GRACIELA MEZA RUIZ
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

RAFAEL MORENO SÁNCHEZ
Instituto Nacional de Cardiología "Dr Ignacio Chávez"

JORGE JOEL REYES MÉNDEZ
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Instituto de Fisiología Celular
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

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES ASOCIADOS

EDMUNDO CHÁVEZ COSÍO
Instituto Nacional de Cardiología "Dr Ignacio Chávez"

MARINA GAVILANES RUIZ
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ELIZABETH LANGLEY McCARRON
Instituto de Investigaciones Biomédicas
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
Facultad de Ciencias Médicas
Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba

ALMA LETICIA BORBOA OSUNA
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Sinaloa

ARMANDO FRANCISCO VARGAS ALBORES
Biotecnología Marina
Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo de Sonora

REVISORES ASOCIADOS AL COMITÉ EDITORIAL

KARLA CARVAJAL AGUILERA
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

RAUL MIGUEL COVIAN
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

SILVIA DEVARS RAMOS
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

OSCAR FLORES HERRERA
Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CECILIA GARCÍA PÉREZ
Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CARLOS GÓMEZ LOJERO
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

LUIS GONZÁLEZ DE LA VARA
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

RICARDO JASSO CHÁVEZ
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

HERMINIA LOZA TAVERA
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

BLAS LOTINA HENNSEN
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

GUADALUPE MALDONADO MERCADO
Depto. de Bioquímica. Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

JOSE LUIS MOLINARI SORIANO
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

FERMÍN PACHECO MOISÉS
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

JUAN LUIS RENDÓN GÓMEZ
Depto. de Bioquímica. Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

HORACIO REYES VIVAS
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

LUIS HUMBERTO SILVEIRA TORRE
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

MARÍA EUGENIA TORRES MARQUEZ
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SALVADOR URIBE CARVAJAL
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

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; teléfono 56-23-21-70, fax 56-16-24-19, correo electrónico beb@laguna.fmedic.unam.mx. 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** (Indice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,500 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP-DF-026 1098; UNAM-Depto de Bioquímica y Facultad de Medicina.

BEB *19*(3): 132-133

EDITORIAL

SE ESTABLECE UN NUEVO PROGRAMA DE VINCULACIÓN ENTRE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA

A partir del segundo número del BEB de este año, apareció en nuestra portada el emblema de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. (SMB), junto al de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. (AMPB). Este cambio refleja el fortalecimiento de los lazos académicos de colaboración que dan origen a una nueva etapa de relaciones entre ambas academias. Este vínculo se ha venido manifestando desde hace algún tiempo en colaboraciones puntuales, como es la publicación en el BEB de las memorias del Congreso de la Rama de Bioenergética de la Sociedad y la inclusión de artículos seleccionados del BEB en la página electrónica de la SMB. Estas acciones han permitido estrechar lazos entre los docentes e investigadores de la bioquímica mexicana.

Una nueva iniciativa de la actual Mesa Directiva de la SMB, nos ha llevado a establecer otra etapa de colaboración, ahora más formal y permanente con la AMPB, la cual favorecerá no sólo una mejor relación entre ambas academias que comparten varios objetivos comunes, sino también un mejor apoyo a la enseñanza y la difusión de la Bioquímica en México.

¿En qué consiste esta nueva etapa de colaboración? Como se mencionó, el proyecto busca la vinculación entre los investigadores y los profesores, es decir, entre la generación del conocimiento y quienes lo difunden y transmiten en las aulas. En este sentido, la SMB, creada en 1957, agrupa a quienes realizan investigación Bioquímica en México y cuenta entre sus miembros con varios de los científicos más destacados a nivel nacional e internacional. Esto ha hecho que la SMB, sea reconocida como una de las sociedades científicas más sólidas y serias del País. En el Artículo Primero de sus estatutos se establece, entre otras cosas, que la SMB buscará: apoyar la discusión de planes de enseñanza de la bioquímica; impulsar la docencia; estimular la formación y edición de publicaciones adecuadas para este fin; impulsar la formación de bioquímicos en México, y organizar seminarios sobre temas químico-biológicos de actualidad.

Por diferentes razones, estos objetivos de apoyo a la enseñanza y la difusión de la bioquímica, no ha tenido la continuidad ni el desarrollo que los fundadores de la SMB plantearon originalmente. Para dar cabal cumplimiento a estos principios, la actual Mesa Directiva de la SMB, ha decidido iniciar un Programa de Vinculación para fortalecer la Enseñanza de la Bioquímica, el cual está orientado particularmente a apoyar a las Instituciones de Educación Superior del País.

Para cumplir con este nuevo Programa, la Mesa Directiva de la SMB ha enviado cartas invitando a las Instituciones de Educación Superior del interior de la República Mexicana, a participar en esta iniciativa, ofreciendo su apoyo para el análisis de las necesidades docentes relacionadas con la bioquímica y para establecer planes formales de trabajo conjunto entre ellas y la SMB. Estos planes de trabajo incluyen la organización e impartición de cursos, pláticas, seminarios o conferencias relacionadas con temas bioquímicos, los cuales se

dirigirán a todos los estudiantes y profesores interesados sin importar el nivel, grado o área de estudio. En estas actividades docentes, que tendrán de 3 a 5 días de duración, participarán miembros numerarios de la SMB, con amplia y profunda experiencia en diversas áreas del conocimiento bioquímico. Con este Programa se pretenden alcanzar las siguientes metas: difundir el conocimiento generado por los bioquímicos mexicanos en el ámbito nacional; establecer lazos de comunicación entre los docentes y los investigadores; fomentar una actitud crítica entre los estudiantes mexicanos; propiciar que se integren a la investigación bioquímica estudiantes de licenciatura, y promover la investigación básica en las universidades del País.

Para establecer estrategias de difusión y logística para este Programa, la SMB, ha solicitado a la AMPB su cooperación y apoyo, ya que ésta mantiene una estrecha relación con los docentes de la bioquímica en los diferentes estados de la República y conoce de las necesidades de los profesores. Así, el trabajo conjunto entre ambas academias, permitirá consolidar este Proyecto y así alcanzar de manera eficiente, los objetivos propuestos. Para que este Proyecto avance, es necesario la participación activa e interés de los profesores y autoridades de las Instituciones de Educación Superior del interior del País.

Iniciamos así una nueva etapa de colaboración con gran entusiasmo y deseamos que juntos contribuyamos al mayor de los éxitos de este Proyecto propuesto por la Mesa Directiva de la SMB, una actividad docente no lucrativa orientada a beneficiar a los estudiantes y a los profesores de Bioquímica de México.

Alejandro Zentella Dehesa
Presidente de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.

Dr. Edmundo Chávez Cossío
Presidente de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

BEB *19*(3): 138-145

FUNCIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Blanca A. Delgado-Coello y Jaime Mas-Oliva. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-243, Ciudad Universitaria 04510. México, D. F., Tel: 56-22-55-84, Fax: 56-22-56-11. Correo electrónico: bravo@servidor.unam.mx

RESUMEN

La regeneración hepática, que en realidad es un proceso hiperplásico compensatorio, es un modelo excelente para estudiar eventos que regulan la proliferación celular controlada, en contraparte a los sistemas neoplásicos. Aún cuando el fenómeno es conocido desde la antigüedad, no se han descifrado los mecanismos que intervienen para que el tejido hepático detecte la pérdida de masa y después la compense mediante una proliferación celular activa. Más aún, se desconocen las señales que detienen el proceso proliferativo. En este trabajo se ilustra cómo las membranas intracelulares, la membrana celular y a su vez las proteínas asociadas a éstas, presentan importantes transformaciones durante el proceso. Asimismo, se hace énfasis en el carácter dinámico de las membranas celulares que responden a señales, tales como el aumento intracelular de calcio y calmodulina durante la regeneración hepática. De esta manera, se discute el papel central de las membranas como mediadoras de la comunicación entre los espacios extra e intracelulares, llevando a cabo el delicado control del proceso proliferativo evocado por la hepatectomía parcial.

PALABRAS CLAVE: Regeneración hepática, hiperplasia compensatoria, hepatectomía parcial, membranas celulares.

ABSTRACT

Liver regeneration, considered as a compensatory hyperplasia, is an excellent model to study the processes involved in normal cellular proliferation, in comparison to neoplastic systems. Although the phenomenon is known since ancient times, nowadays many of the mechanisms involved in the way liver cells sense tissue loss have been poorly elucidated. Moreover, many of the signals that indicate when the process should stop and prevent further growth are still unknown. In this study, we review the way intracellular membranes, cell membranes and their associated proteins can be considered as targets in the control of the proliferative response. The dynamic role that membranes play in the cellular physiology in response to signals such as those carried out by calcium and calmodulin during the regenerative process is emphasized. The central role that membranes play as mediators in the communication established between the intra and extracellular spaces, triggering a proliferative process evoked after partial hepatectomy, is discussed.

KEY WORDS: Liver regeneration, compensatory hyperplasia, partial hepatectomy, cellular membranes.

INTRODUCCIÓN

El hígado es un órgano sumamente complejo, tanto desde el punto de vista anatómico como funcional. Los tipos celulares que conforman este órgano son los siguientes: células parenquimatosas representadas en un 60% o un 80% por hepatocitos (en función del número o del volumen, respectivamente) y células no parenquimatosas (35 ó 17% de acuerdo al número y volumen) que comprenden a las células endoteliales fenestradas, a las células de Kupffer, a las células perisinusoidales, esteladas o de Ito y a los linfocitos (1). El hígado es un órgano que participa activamente en reacciones de síntesis de metabolitos, secreción y detoxificación, por ello es posible entender su gran capacidad para adaptarse ante perturbaciones metabólicas (2).

En forma característica, las células hepáticas son quiescentes con un índice mitótico de 1 mitosis/ 20,000 células (3) y además son altamente diferenciadas. Sin embargo, son capaces de replicarse ante estímulos químicos, físicos, infecciosos o por hepatectomía parcial. El primer reporte de la capacidad regenerativa del hígado se remonta a la antigua cultura griega, cuando en el relato mítico, Prometeo

osó robar el fuego a los dioses del Olimpo y lo entregó a los hombres. Como castigo, Zeus lo condenó a permanecer encadenado al Monte Cáucaso donde un ave de rapiña se encargaría de picar diariamente su hígado y dada su implícita capacidad regenerativa, el castigo sería eterno. Hoy en día, se ha calculado matemáticamente que los hepatocitos tienen el potencial real de sostener al águila de Prometeo.

Si se considera que un hígado de rata en condiciones normales contiene 3×10^8 hepatocitos, y que una sola célula a través de 34 divisiones produce 1.7×10^{10} células, la capacidad clonogénica de los hepatocitos, daría lugar potencialmente a 50 hígados de rata (4). Después de que un estímulo o la influencia de factores de crecimiento sobre hepatocitos en cultivo, inducen a la proliferación, ocurre una desdiferenciación, las células proliferan activamente y se rediferencian para formar hepatocitos maduros. Así, aparentemente las células hepáticas pueden proliferar de manera casi ilimitada y asegurar su propia autopreservación (4).

La regeneración hepática puede inducirse a través de una hepatectomía parcial, definida como aquella cirugía en la que se extraen los dos lóbulos mayores de la masa hepática, *i.e.* el medio y el lateral izquierdo (la rata posee 2 lóbulos más, el lateral derecho y el caudado).

La capacidad de regeneración hepática se ha observado en todos los mamíferos estudiados a la fecha. Este proceso parece ser un mecanismo que evolutivamente protege a los animales en la naturaleza, de los efectos catastróficos que las toxinas de los alimentos, las infecciones virales y otros estímulos puedan tener sobre el hígado (4).

En sentido estricto el hígado no se regenera, sino que sufre una hiperplasia o regeneración compensatoria (2), lo que implica que aumenta su tamaño hasta alcanzar una masa óptima que en los mamíferos corresponde entre un 2.5 y un 3% de la masa corporal. Tal proporción se cumple cuando se transplantan hígados de babuinos en humanos, el órgano crece hasta alcanzar el tamaño del hígado humano, o cuando un perro chico recibe el hígado de un perro grande, el hígado transplantado reduce su tamaño hasta ser proporcional al nuevo tamaño corporal (4). El control de esta proporcionalidad es muy riguroso, pues si ésta se rebasa mediante el uso de factores hepatotróficos, se compromete la sobrevivencia de los animales. Cuando la proliferación hepática se induce por agentes químicos, el mecanismo se llama hiperplasia directa.

En general se conoce bastante bien la sucesión de eventos durante la hiperplasia regenerativa; sin embargo, las señales que indican cuándo comenzar y concluir el proceso, no se conocen. El inicio del proceso regenerativo tiene lugar en los primeros instantes posteriores a una hepatectomía, cuando los hepatocitos regularmente estables en la fase G0 del ciclo celular, sufren cambios que reactivan al ciclo celular y les permite pasar hacia la siguiente etapa del ciclo conocida como G1. Posiblemente esta transición se dispare por factores previamente existentes en la célula.

Después de una hepatectomía parcial, ocurre lo que se llama una sinfonía portal que involucra una cascada de hormonas que son vertidas a la circulación portal y que juntas forman la primera señal que induce a proliferar a las células hepáticas remanentes. La activación de estas células se conoce como onda replicativa de hepatocitos, debido a que la duplicación comienza de las regiones periportales a las pericentrales. El papel de señalización de la sinfonía portal es indicado porque son precisamente las células periportales las que muestran las mayores respuestas en forma de una síntesis activa de ADN y de división mitótica después de una hepatectomía parcial. La liberación de varias hormonas, entre ellas vasopresina, conduce a la activación vía una proteína G, de fosfolipasas C que activan los sistemas transductores del inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y del 1,2-diacilglicerol (DAG). El primero de estos sistemas incide en la liberación de Ca^{2+} de sitios de almacenamiento celular y el segundo, en la activación de una proteína cinasa C. Resaltan dentro de las señales de la sinfonía portal, las oleadas de glucagón, de vasopresina y la disminución de calcio en plasma.

Después de 2 a 4 h de realizada la hepatectomía parcial, ocurre un aumento en la síntesis y acumulación citosólica de calmodulina. A las 24 h, la síntesis de ADN es máxima y el 35% de los hepatocitos están en duplicación (en ratas jóvenes el 95% de los hepatocitos se dividen al menos una vez). Las células no parenquimatosas también entran en mitosis,

pero con un retraso de aproximadamente 24 h respecto a lo observado en hepatocitos (3). A las 72 h, el 80% del hígado se ha regenerado. El proceso total de recuperación dura de 7 a 10 días.

CAMBIOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DURANTE LA REGENERACIÓN

i) Movilidad electroforética y punto isoeléctrico

La activación proliferativa de las células hepáticas está asociada con cambios fisicoquímicos y funcionales en las membranas plasmática e intracelulares, aunque los mecanismos involucrados no son del todo conocidos.

Los primeros intentos por determinar lo que ocurre en la superficie de la célula hepática en regeneración, datan de la década de los 60's. En un principio, se detectó un aumento máximo en la movilidad electroforética de las proteínas obtenidas de suspensiones celulares provenientes de hígados de ratas hepatectomizadas 48 h antes. Este fenómeno fue interpretado como la formación de complejos entre el calcio y macromoléculas de carga negativa. Más adelante se propuso que este incremento podía explicarse por un aumento en la concentración de ácido N-acetil neuramínico en la superficie celular, el cual por acción de una neuraminidasa, era liberado en mayor proporción en las células provenientes de animales hepatectomizados. Estos trabajos sugieren que algunos grupos químicos se modifican en la superficie de las células durante la regeneración hepática.

Algunos otros parámetros que se han evaluado en la membrana plasmática son el punto isoeléctrico (PI) y la carga superficial. El punto isoeléctrico de hepatocitos normales medido por análisis de equilibrio isoeléctrico en un intervalo de pH de 3 a 10, tiene un valor de 4.4. En contraste, un 80% de las células en regeneración muestran un PI de 4.8 (5). En el 20% restante se determinó un PI cercano a 5.3. Los valores del PI vuelven a los índices normales después de 72 h de realizada la hepatectomía parcial. Pueden plantearse algunas hipótesis que expliquen la heterogeneidad del PI de las membranas durante la regeneración. Dado que los datos anteriores indican pérdida de proteínas (que no son sialoglucoproteínas), éstas pudieran ser mucoproteínas sulfatadas. Más aún, se ha propuesto que puede existir una modificación en la fosforilación de proteínas de membrana o en la síntesis de fosfolípidos (5).

Las células en regeneración tienen una menor densidad de cargas en la membrana plasmática que las células normales. La densidad de los grupos carboxílicos no se altera y la densidad de los grupos no carboxílicos se reduce en un 26%. También cabe notar que la cantidad de grupos SH es mayor en las células en regeneración y dado que se han relacionado con la duplicación celular, podrían ser relevantes durante el proceso regenerativo (5).

ii) Fluidez de membrana

El análisis de la fluidez de las membranas tiene relación con funciones involucradas con el proceso proliferativo como son: permeabilidad, movilidad de receptores y antígenos, actividades enzimáticas y aglutinación de lectinas.

En un estudio realizado en 1980, se encontró que existe un aumento en la fluidez en la superficie de la membrana asociado con la regeneración hepática. La composición de lípidos no se altera, aunque se detectó una menor insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos a los tiempos de 4 y 5 h posteriores a la cirugía, mientras que a las 24 h el índice de saturación fue mayor. Sin embargo, la relación colesterol/fosfolípidos (COL/FL) disminuyó de manera significativa, después de 15 h de realizada la hepatectomía parcial (6).

En 1994, Kohmoto (7) reportó que la relación COL/FL aumenta significativamente en la membrana plasmática de los hepatocitos aislados de los lóbulos hepáticos a las 12 y 72 h después de ligar la rama portal. Sin embargo, midiendo la polarización de fluorescencia de las membranas, como un índice de fluidez membranal, no se encontraron diferencias importantes entre las membranas que provienen de los lóbulos no ligados y los controles (7).

No existen en la literatura datos comparativos de las membranas de hígado normales y en regeneración que reflejen cambios importantes en los lípidos de membrana, sin embargo, recientemente se han descrito eventos hiperlipidémicos a nivel plasmático en el hígado en proliferación. Tales eventos se han observado de 24 a 48 h posteriores a una dosis aguda de tetracloruro de carbono (CCl_4), cuando ocurre un in-

cremento de triacilglicéridos y colesterol total en plasma con una disminución paralela de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Un segundo estado hiperlipidémico ocurre a los 5 días, en el cual los niveles de triacilglicéridos y colesterol vuelven a la normalidad y las partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las de muy baja densidad (VLDL), aumentan 3 ó 4 veces respecto a la basal. Por otro lado, la intervención de los lípidos en el proceso de regeneración hepática se ha comprobado en hepatocitos de rata estimulados, para su regeneración, con el factor recombinante de crecimiento hepático humano. A las 12 h del tratamiento se observó una inhibición transitoria de la liberación de triacilglicerol, de colesterol total y de fosfolípidos en suero, mientras que a las 36 h del tratamiento la síntesis de lípidos y de lipoproteínas fue estimulada al máximo.

iii) Peroxidación de lípidos en la membrana plasmática

Un modelo alternativo al modelo quirúrgico de hepatectomía parcial, es el tratamiento agudo de ratas con CCl_4. Una hipótesis propone que no es el propio compuesto el que tiene efecto tóxico sobre el hígado, sino un producto de su biotransformación, el radical libre triclorometilo ($\cdot CCl_3$) (8). De esta forma, tanto los radicales libres como la lipoperoxidación están involucrados en el ajuste metabólico que tiene lugar en el hígado en proliferación. Los radicales libres de oxígeno se han propuesto como mediadores potenciales de las etapas tempranas del proceso regenerativo (3).

La intervención de los radicales libres ha sido comprobada por el uso de compuestos que contrarrestan al CCl_4, aún cuando sea aplicado de manera crónica (9). Los antídotos principales estudiados para su aplicación terapéutica en humanos, son la colchicina y la silimarina. Ambos compuestos tienen propiedades quelantes de radicales libres y estabilizantes de la membrana, lo cual explica que eviten la necrosis e inhiban la lipoperoxidación generada por el tratamiento con CCl_4 (9).

Se ha reportado en ratas, que la lipoperoxidación aumenta en la membrana plasmática y en fracciones citosólicas, utilizando la hepatectomía parcial y la administración aguda de CCl_4 (10). La lipoperoxidación aumentó drásticamente en un 50 y 70% después de realizar una hepatectomía parcial. Empleando el mismo modelo, se observó en las membranas de los microsomas, una disminución en la lipoperoxidación. En contraste, utilizando el modelo con CCl_4, se observó un aumento en la lipoperoxidación en las membranas de los microsomas y de los núcleos. Estos resultados indican un carácter cualitativamente distinto de la lipoperoxidación en ambos modelos y que es factible que la proliferación inducida ocurra a través de mecanismos distintos.

iv) Efectos sobre enzimas de la membrana plasmática

Las proteínas de la membrana plasmática no son ajenas a la serie de cambios provocados por una hepatectomía parcial. A tiempos muy cortos (1 a 5 min), se ha logrado determinar que en la membrana de los hepatocitos se expresa un receptor de urocinasa, no presente en el hepatocito normal, por lo que la actividad de la urocinasa aumenta rápidamente (4). La urocinasa participa en la activación del factor de crecimiento específico de hepatocitos, el cual a su vez es relevante en la reparación del tejido hepático.

En el modelo de hepatectomía parcial, la actividad de la fosfatasa alcalina aumenta en el transcurso de las 48 h posteriores a la cirugía, en tanto que la leucin-aminopeptidasa y la 5'-nucleotidasa disminuyen a partir de las 48 y 12 h posteriores, respectivamente (11).

Nuestro grupo demostró que la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}-Mg^{2+} hepática disminuye rápidamente después de practicar hepatectomía parcial en ratas (Fig 1) y que su recuperación ocurre hasta los 20 días posteriores cuando la actividad se aproxima a la basal (12). Hemos demostrado también una expresión diferencial de las isoformas generadas por edición alternativa del ARNm de la ATPasa de Ca^{2+} hepática en relación directa con el estadio de regeneración.

Otros grupos han reportado que la actividad de la ATPasa de Na^+-K^+ aumenta progresivamente después de la hepatectomía parcial, alcanzando a las 12 h una estimulación de 3 veces el nivel basal. El aumento en la actividad de la enzima correlaciona con una mayor expresión de sus subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$. Las características de la inducción de la enzima sugieren que algunos eventos traduccionales y post-traduccionales pueden estar relacionados con el aumento en la actividad de esta bomba (13). Se ha detectado que desde las 4 h posteriores a la hepatectomía ocurre un aumento en la actividad de la

ATPasa de Na^+-K^+ asociado claramente a un dominio específico de la membrana hepática. Este incremento en la actividad de esta bomba electrogénica es fundamental en la supervivencia y mantenimiento de las funciones celulares después de una hepatectomía parcial, como se describirá más adelante.

Después de una hepatectomía parcial la membrana plasmática del hepatocito sufre una serie de cambios que afectan a los receptores embebidos en ellas. En la etapa de transición de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular, los hepatocitos que sobreviven a la hepatectomía deben detener la degradación de proteínas y bombear más aminoácidos y glucosa hacia el interior de la célula. Además, la célula expresa más receptores de insulina y provoca que los complejos insulina-receptor permanezcan acoplados por más tiempo en la superficie de la célula (Fig 1). La activación de los receptores de insulina, provoca que más transportadores de glucosa se ubiquen en la membrana y promueve un aumento en el gradiente de sodio a través de la membrana, el cual aumenta la capacidad de los nuevos transportadores para movilizar más aminoácidos hacia la célula. Es factible que todos estos cambios en la actividad de la ATPasa de Na^+-K^+, más los cambios detectados en los grupos químicos membranales, pudieran estar relacionados con la hiperpolarización membranal.

La insulina, a través de mecanismos desconocidos promueve la transcripción de genes de ARNr y el flujo de ARNm desde el núcleo a los ribosomas para manejar la carga adicional de ARNm y aminoácidos. La disminución abrupta en la concentración de insulina y el aumento de glucagón después de la hepatectomía parcial, previenen la hipoglucemia que puede acompañar a la pérdida de masa hepática.

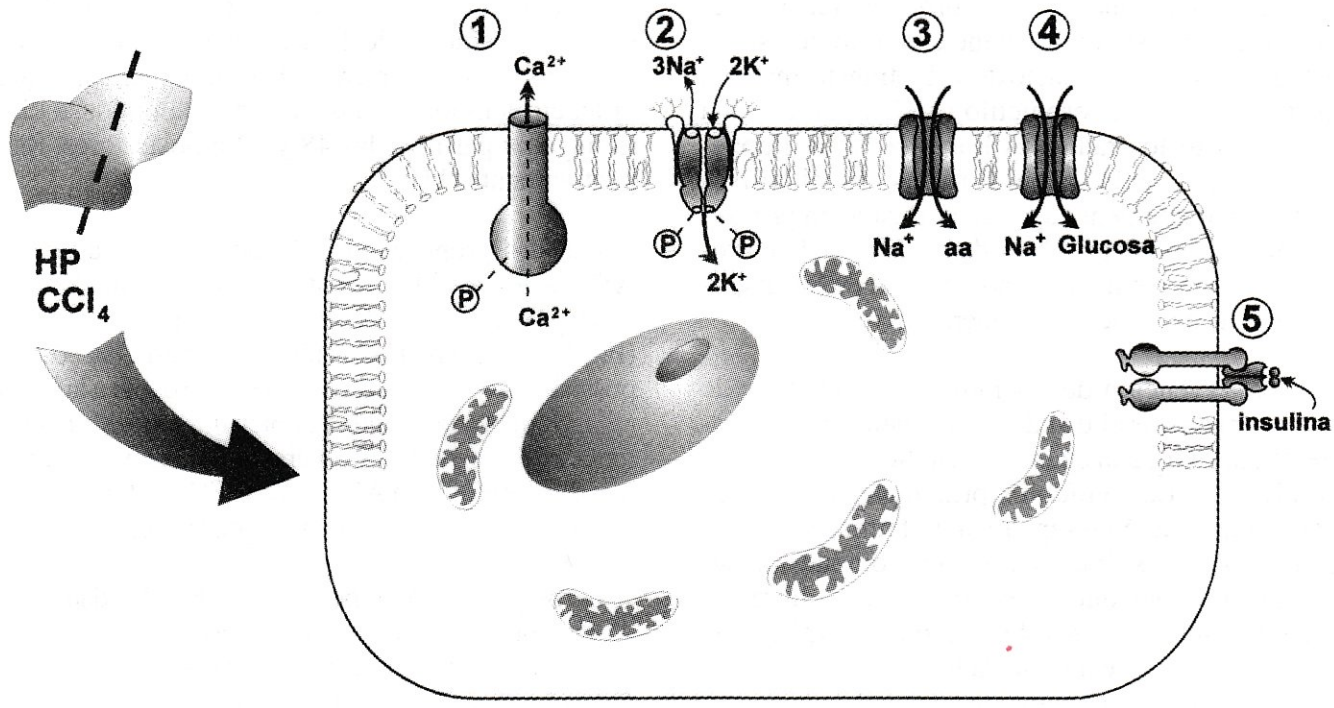


Figura 1. Cambios en algunas proteínas integrales de la membrana plasmática, durante la regeneración hepática inducida por la hepatectomía parcial (HP) o por el tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl_4). **(1)** actividad de la ATPasa de Ca^{2+} la cual se encuentra disminuida (línea punteada); **(2)** la ATPasa de Na^+-K^+ aumenta su actividad (línea continua) y por lo tanto el gradiente transmembranal de sodio; **(3)** los aminoácidos **(4)** y la glucosa son transportados con mayor eficiencia hacia el citosol; **(5)** la insulina permanece más tiempo acoplada a sus receptores a la vez que aumenta el número de éstos en la membrana plasmática.

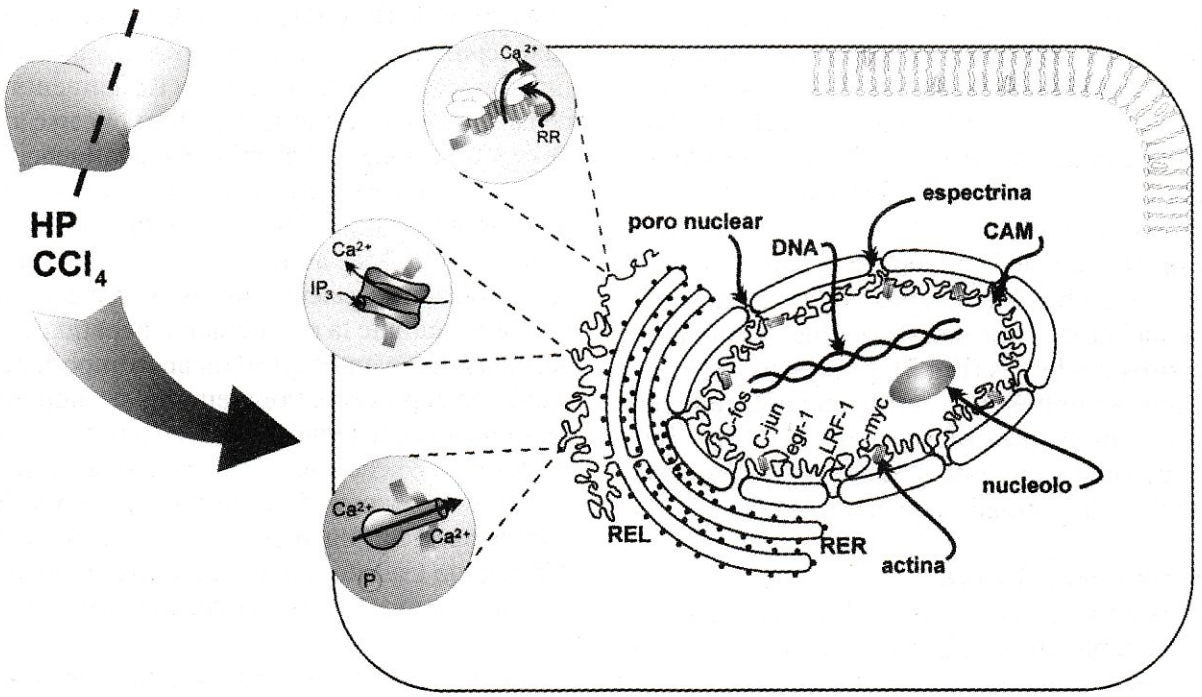


Figura 2. Cambios en la envoltura nuclear y membranas del retículo endoplásmico liso (REL) durante la regeneración hepática promovida por hepatectomía parcial (HP) o por tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl_4). En la región intranuclear y en los poros nucleares se incrementan la espectrina y la actina, provocando posiblemente la condensación de la cromatina. Se indican también flujos de calmodulina (CAM) relacionados con estos cambios y algunos genes relacionados con la homeostasis del ciclo celular que se activan después de practicar hepatectomía parcial. En el REL, destacan los cambios que sufren los receptores de liberación de calcio: el receptor de rianodina (RR) y el de IP_3, además de la ATPasa de Ca^{2+} que aumenta su actividad. Los cambios esquematizados no son eventos sincrónicos del proceso regenerativo.

OTROS CAMBIOS EN LAS MEMBRANAS INTRACELULARES DURANTE LA REGENERACIÓN CELULAR

i) Envoltura nuclear

Una hora después a la pérdida de masa hepática, los hepatocitos aumentan la transcripción de genes y/o el procesamiento de transcritos primarios, además del movimiento de transcritos del ARNm fuera del núcleo, lo que produce una oleada de mensajeros recién sintetizados hacia los polirribosomas. La concentración de estos mensajeros incrementa de manera constante hasta las 16 h posteriores a la hepatectomía, antes de la duplicación del ADN. En los 30 min posteriores a la hepatectomía, ocurre una inducción colectiva de genes del ciclo celular que normalmente no se expresan en los hepatocitos. Los transcritos de estos genes se traducen en proteínas que actúan como cebadores, regulando la transición hacia el estado proliferativo por lo que se conocen como genes inmediatos tempranos o de primera respuesta. Actualmente se han descrito más de 70 genes de este tipo relacionados con la regeneración hepática (3), cuya inducción es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas (2). Entre otros, destacan los transcritos de *c-fos* que se detectan a los 10-25 min y los de *c-myc* que alcanzan un máximo en 1-3 h posteriores a la cirugía.

Es muy probable que ninguno de los cambios que se suceden en respuesta a un proceso de pérdida de masa hepática, lo haga de manera independiente de los demás. Un ejemplo de ello es el incremento temprano en los niveles de calmodulina, el cual se encuentra estrechamente asociado a otros eventos en las membranas intracelulares.

La calmodulina acumulada en el citosol se transloca hacia el núcleo y se asocia con la matriz nuclear, lo cual implica a su vez un posible papel en el inicio de la duplicación del ADN (14). El aumento de calmodulina se relaciona con el aumento y la activación de proteínas involucradas en el sistema contráctil intranuclear. La activación proliferativa de los hepatocitos induce un aumento de α-espectrina y de la cinasa de la cadena ligera de miosina, ambas localizadas en la matriz y envoltura nucleares, la primera se encuentra además en los poros nucleares (Fig 2). El proceso regenerativo activa también a la actina que podría tener relación con la modulación de la actividad transcripcional y el control de la relajación-condensación de la cromatina en el núcleo (14).

ii) Retículo endoplásmico

La oleada citosólica de calmodulina detectada en la fase pre-replicativa de la regeneración hepática, también se ha relacionado con un aumento en la fluidez de las membranas del retículo endoplásmico y cambios en la actividad de las enzimas ubicadas en estas membranas. Por ejemplo, se ha detectado un incremento en la actividad de la enzima microsomal guanilato ciclasa, que podría reflejar las interacciones hidrofóbicas de calmodulina con la membrana del retículo y la modificación subsecuente de los lípidos membranales (15). El coeficiente de Hill disminuye cuando se activa esta enzima con Mn·GTP, en presencia de calmodulina, lo cual indica una pérdida de cooperatividad consistente con el aumento de fluidez del microambiente lipídico de la enzima. Este trabajo apoya también la propuesta de que la intervención temprana de la modulación por calmodulina puede activar múltiples eventos celulares.

Los niveles de calcio libre presentes en el citosol también sufren variaciones drásticas después de una hepatectomía parcial (16) lo cual conlleva a cambios en el retículo endoplásmico liso, esencial en la regulación de los niveles del catión en el citosol.

En apariencia, la enzima específica del retículo endoplásmico liso, la glucosa-6-fosfatasa, no sufre cambios en su actividad respecto a controles laparotomizados. Sin embargo, a nivel de receptores se han reportando hallazgos muy interesantes (16). El retículo endoplásmico cuenta con al menos dos moléculas que intervienen en la liberación de calcio: el receptor de IP_3 y el receptor de rianodina (Fig 2). El receptor de rianodina reduce notablemente la afinidad por su ligando ya que su Kd aumenta de 10 nM a 130 nM. Esto último podría explicarse a través de modificaciones covalentes, por la influencia de alguna proteína asociada o bien, por la expresión de una variante distinta del receptor durante el proceso regenerativo. Más aún, se ha observado una clara redistribución del calcio entre los diferentes organelos celulares durante la regeneración hepática, con una secuencia de eventos que indican la importancia del catión en el proceso. Por ejemplo, el calcio total se incrementa en los microsomas en un 85% a las 24 h posteriores a la hepatectomía parcial, al tiempo que la Kd del receptor de rianodina aumenta, lo que correlaciona con un incremento en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de retículo endoplásmico, a pesar del incremento en la Bmax del receptor de IP_3 (16).

Por otro lado, mientras la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática disminuye sensiblemente después de una hepatectomía (12), la ATPasa de Ca^{2+} microsomal aumenta su actividad a las 18 h después de la hepatectomía (17). Estos cambios, se manifiestan a tiempos cortos, con un aumento en la concentración de calcio intracelular libre (y su disminución plasmática), pues aunque la ATPasa microsomal aumenta su actividad, ésta no tiene la capacidad suficiente para capturar el calcio acumulado. A las 24 h posteriores a la cirugía, el calcio total aumenta su concentración en mitocondrias, alcanzando un máximo de un 70% respecto al control a las 48 a 96 h, mientras que en el citosol disminuye a partir de las 12 h y alcanza una disminución máxima de 71%, a las 96 h después de la hepatectomía (16). El incremento en la concentración de calcio en el núcleo, posiblemente asociado a la calmodulina que se transloca desde el citosol, tiene un papel fundamental en la duplicación de ADN en los hepatocitos en proliferación.

CONCLUSIONES

La regeneración hepática representa un excelente modelo de proliferación celular desencadenado por eventos específicos cuyos mecanismos de control más finos son aún materia de discusión. En este trabajo queda constancia de los complicados mecanismos involucrados en este proceso donde se muestra la fun-

ción vital de las membranas celulares en la regeneración del tejido hepático. A medida que los procesos bioquímicos asociados con las membranas celulares durante el proceso de regeneración celular se entiendan mejor, las posibilidades de reconocer y manipular estos procesos, aumentará la probabilidad de controlar el desarrollo celular, tanto en sistemas de crecimiento controlado o normal así como en sistemas de crecimiento descontrolado o neoplásico.

REFERENCIAS

1. Kietzmann T y Jungermann K (1997) Metabolic zonation of liver parenchyma and its short-term and long-term regulation. En: Functional heterogeneity of liver tissue: from cell lineage diversity to sublobular compartment specific pathogenesis. Editor: Vidal-Vanaclocha F R G Landes Company, pp 1-32.

2. Columbano A y Shinozuka H (1996) Liver regeneration versus direct hyperplasia. FASEB J *10*:1118-1128.

3. Steer C J (1995) Liver regeneration. FASEB J *9*:1396-1400.

4. Michalopoulos G K y DeFrances M C (1997) Liver regeneration. Science *276*:59-66.

5. Cajone F y Gaja G (1985) Plasma membrane changes in hepatocytes from normal and regenerating rat liver. Eur J Cell Biol *38*:174-177.

6. Bruscalupi G, Curatola G, Lenaz G, Leoni S, Mangiantini M T, Mazzanti L y Spagnuolo S (1980) Plasma membrane changes associated with the rat liver regeneration. Biochim Biophys Acta *597*:263-273.

7. Kohmoto M, Tanaka J, Yoshida M, Kasamatsu T, Fujita K I, Zhong W B, Kaidou T, Tamura J y Imamura M (1994) Plasma membrane fluidity during regeneration and atrophy of the rat liver following portal branch ligation. Eur Surg Res *26*:221-229.

8. Raymond P y Plaa G L (1996) Ketone potentiation of haloalkane-induced hepatotoxicity: CCl_4 and ketone treatment on hepatic membrane integrity. J Toxicol Environ Health *49*:285-300.

9. Favari L y Pérez-Alvarez V (1997) Comparative effects of colchicine and sylimarin on CCl4-chronic liver damage in rats. Arch Med Res *28*(1):11-17.

10. Aguilar-Delfin I, López-Barrera F y Hernández-Muñoz R (1996) Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration partial hepatectomy and acute CCl_4 administration. Hepatology *24*(3):657-662.

11. Wrigth G H (1977) Changes in plasma membrane enzyme activities during liver regeneration in the rat. Biochim Biophys Acta *470*:368-381.

12. Mas-Oliva J, Pérez-Monfort R, Cardenas-García M y Rivas-Duro M (1991) Altered coupling states between calcium transport and (Ca^{2+}, Mg^{2+})-ATPase in the AS-30D ascites hepatocarcinoma plasma membrane. Mol Cell Biochem *100*:39-50.

13. Martínez-Mas J V, Peinado-Onsurbe J, Ruiz-Montasell B, Felipe A, Casado F J y Pastor-Anglada M (1995) Na+,K(+)-ATPase expression during the early phase of liver growth after partial hepatectomy. FEBS Lett *362*:85-88.

14. Bachs O, Lanini L, Serratosa J, Josep Coll M, Bastos R, Aligué R, Rius E y Carafoli E (1990) Calmodulin-binding proteins in the nuclei of quiescent and proliferatively activated rat liver cells. J Biol Chem *265*(30):18595-18600.

15. Kopeikina L, Degiannis E, Villiotou V y Stavridis I (1997) Calmodulin-related changes in microsomal membrane fluidity during liver regeneration. J Surg Res *67*:155-162.

16. Díaz-Muñoz M, Cañedo-Merino R, Gutiérrez-Salinas J y Hernández-Muñoz R (1998) Modifications of intracellular calcium release channels and calcium mobilization following 70% hepatectomy. Arch Biochem Biophys *349*(1):105-112.

17. Deliconstantinos G y Ramantanis G. (1983). Alterations in the activities of hepatic plasma membrane and microsomal enzymes during liver regeneration. Biochem J *212*:445-452.

BEB *19*(3): 146-157

LA PARTICIPACIÓN DEL EFECTO HIDROFÓBICO Y DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO INTRAMOLECULARES EN LA ESTABILIDAD CONFORMACIONAL DE LAS PROTEÍNAS

Oscar Flores-Herrera, 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., Tel: 56-23-21-68, Fax: 56-16-24-19. Correo electrónico: fedem@servidor.unam.mx

RESUMEN

Durante más de tres décadas se ha establecido que el efecto hidrofóbico es la fuerza estabilizadora que dirige el plegamiento de las proteínas. Por otra parte, aunque la participación de los puentes de hidrógeno en este fenómeno es importante, ha sido difícil determinar su magnitud. El estudio del plegamiento de las proteínas empleando la mutagénesis dirigida ha permitido obtener suficiente información para sugerir que el efecto hidrofóbico y los puentes de hidrógeno intramoleculares son las principales fuerzas que estabilizan la estructura nativa de las proteínas, y que su contribución es en la misma magnitud.

PALABRAS CLAVE: Estabilidad de proteínas, plegamiento de proteínas, puentes de hidrógeno, efecto hidrofóbico.

ABSTRACT

For the last 30 years, the general view has been that the hydrophobic effect is the dominant force in protein folding. It is clear that intramolecular hydrogen bonds are essential to the structure and stability of proteins. It is not clear, however, whether they represent a net favorable contribution to this stability. Studies with altered proteins generated by directed mutagenesis have provided enough information to suggest that the hydrophobic effect and the intramolecular hydrogen bonds are the principal forces involved in this process. Also, these results suggest that hydrogen bonding and the hydrophobic effect make large and comparable contributions to the stability of globular proteins.

KEY WORDS: Protein stability, protein folding, hydrogen bonding, hydrophobic effect.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son el principal componente biológico diseñado para la manutención del metabolismo, y como consecuencia, de la vida. Sin embargo, las proteínas requieren adoptar una conformación tridimensional cuya estabilidad es, por lo general, de entre 5 y 15 kcal/mol (21 a 63 kJ/mol) mayor que la del estado desnaturalizado, el cual es biológicamente inactivo. El valor neto de la estabilidad conformacional es el resultado del balance de diferentes fuerzas, de las cuales la entropía conformacional es la principal fuerza desestabilizadora, mientras que el efecto hidrofóbico y la formación de puentes de hidrógeno son las principales fuerzas estabilizadoras de la estructura nativa de las proteínas.

Al plegarse una proteína adquiere una conformación en donde el 83% de la superficie de los residuos de aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Cys), el 70% de los enlaces peptídicos, el 63% de los residuos de aminoácidos polares sin carga (Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr) y el 54% de los residuos con carga (Arg, Lys, His, Asp, Glu) se encuentran ocultos en su interior, lejos del contacto con el agua del medio (1). Aunado a esto, por cada residuo de aminoácido se forman 1.1 puentes de hidrógeno intramoleculares. La contribución de estos dos factores a la estabilidad de las proteínas es uno de los campos de estudio de la bioquímica que ha avanzado de forma importante en los últimos años.

Un enfoque para estudiar la contribución de estas interacciones es hacer una mutación en la secuencia de los residuos de aminoácidos de una proteína para remover específicamente un grupo químico involucrado en la formación de un puente de hidróge-

Tabla I
Valores de Δ(ΔG)para las mutantes hidrofóbicas de diferentes proteínas

Proteína	Resíduo	% oculto	Δ(ΔG)(kcal/mol) Obs[A]	Corr[B]	Por CH_n[C]	Obs[A]	Corr[B]	Por CH_n[C]
			Leu → Gly			Leu → Ala		
Nucleasa[D]	7	86	1.5	1.7	0.4	1.6	1.9	0.6
	14	89	3.7	4.2	1.1	2.3	2.6	0.9
	25	100	4.5	4.5	1.1	2.7	2.7	0.9
	36	100	5.3	5.3	1.3	3.5	3.5	1.2
	37	100	3.8	3.8	1.0	1.7	1.7	0.6
	38	100	0.6	0.6	0.2	1.7	1.7	0.6
	89	90	3.2	3.6	0.9	2.6	2.9	1.0
	103	100	6.6	6.6	1.7	4.6	4.6	1.5
	108	94	7.2	7.7	1.9	5.8	6.2	2.1
	125	100	7.0	7.0	1.8	4.9	4.9	1.6
	137	56	4.6	8.2	2.1	2.3	4.1	1.4
Barnasa[F]	14	100				4.5	4.5	1.5
Lisoz T4[G]	46	100				2.7	2.7	1.0
	99	100				5.0	5.0	1.7
	118	90				3.5	3.9	1.3
	121	100				2.7	2.7	1.0
	133	100				3.8	3.8	1.3
CI-2[H]	27	100				2.7	2.7	0.9
	68	100				3.8	3.8	1.3
Promedio ± DE		94 ± 11.1	4.4 ± 2.1	4.8 ± 1.9	1.2 ± 0.6	3.5 ± 1.3	3.5 ± 1.3	1.2 ± 0.4
			Val → Gly			Val → Ala		
Nucleasa[D]	23	100	5.6	5.6	1.9	2.9	2.9	1.5
	39	100	4.7	4.7	1.6	2.2	2.2	1.1
	51	12	0.4	3.3	1.1	0.3	2.5	1.3
	66	100	4.4	4.4	1.5	2.2	2.2	1.1
	74	100	6.6	6.6	2.2	3.1	3.1	1.6
	99	100	5.0	5.0	1.7	3.2	3.2	1.6
	104	100	6.5	6.5	2.2	2.9	2.9	1.5
	111	100	4.9	4.9	1.6	4.7	4.7	2.4
	114	99	0.2	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0
G5P[E]	35	100				1.1	1.1	0.6
	47	100				2.3	2.3	1.2
Promedio ± DE		92 ± 27	4.3 ± 2.4	4.6 ± 1.9	1.5 ± 0.6	2.3 ± 1.4	2.5 ± 1.2	1.3 ± 0.6
			Met → Gly			Met → Ala		
Nucleasa[D]	26	52	2.2	4.2	1.4	1.5	2.9	1.5
	32	81	2.4	3.0	1.0	1.7	2.1	1.1
	65	89	4.6	5.2	1.7	2.0	2.2	1.1
	98	99	4.5	4.5	1.5	4.6	4.6	2.3
Promedio ± DE		83 ± 21	3.4 ± 1.3	4.2 ± 0.6	1.4 ± 0.3	2.5 ± 1.4	3.0 ± 0.9	1.5 ± 0.6
			Phe → Gly			Phe → Ala		
Nucleasa[D]	34	100	6.2	6.2	0.9	3.7	3.7	0.6
	61	64	4.8	7.5	1.1	2.3	3.6	0.6
	76	91	4.7	5.2	0.7	4.0	4.4	0.7
Lisoz T4[G]	153	100				3.5	3.5	0.6
Promedio ± DE		89 ± 17	5.2 ± 0.8	6.3 ± 0.8	0.9 ± 0.2	3.4 ± 0.7	3.8 ± 0.3	0.6 ± 0.1

Tabla I *(continuación)*
Valores de Δ(ΔG)para las mutantes hidrofóbicas de diferentes proteínas

Proteína	Resíduo	% oculto	Δ(ΔG) (kcal/mol) Obs[A]	Corr[B]	Por CH_n[C]	Obs[A]	Corr[B]	Por CH_n[C]	Obs[A]	Corr[B]	Por CH_n[C]
			Ile → Gly			Ile → Ala			Ile → Val		
Nucleasa[D]	15	67	3.3	4.9	1.2	2.7	4.0	1.3	0.8	1.2	1.2
	18	76	2.5	3.3	0.8	2.5	3.3	1.1	1.1	1.5	1.5
	72	97	6.5	6.7	1.7	5.1	5.3	1.8	1.8	1.9	1.9
	92	100	6.6	6.6	1.7	4.0	4.0	1.3	0.5	0.5	0.5
	139	83	4.4	5.3	1.3	3.5	4.2	1.4	1.5	1.8	1.8
G5P[E]	47	100				3.5	3.5	1.2	1.2	1.2	1.2
Barnasa[F]	4	68				1.3	2.0	0.7	0.6	0.9	0.9
	25	87				3.5	4.0	1.3	1.1	1.3	1.3
	51	100				4.7	4.7	1.6	1.8	1.8	1.8
	55	47				1.2	2.5	0.8	0.3	0.5	0.5
	76	100				1.9	1.9	0.6	0.8	0.8	0.8
	88	100				4.2	4.2	1.1	1.3	1.3	1.3
	96	100				3.4	3.4	1.1	1.0	1.0	1.0
	109	86				2.1	2.4	0.8	0.8	0.9	0.9
Lisoz T4[G]	3	80				0.9	1.1	0.4	0.5	0.6	0.6
CI-2[H]	39	100							1.2	1.2	1.2
	48	93							1.0	1.0	1.0
	76	100							-0.2	-0.2	-0.2
RN-T1[I]	61	100							2.0	2.0	2.0
	90	100							1.1	1.1	1.1
Promedio ± D.E.		89 ± 15	4.7 ± 1.9	5.4 ± 1.4	1.3 ± 0.4	3.0 ± 1.3	3.4 ± 1.2	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.5

A = es el valor del Δ(ΔG) determinado experimentalmente [$\Delta(\Delta G) = \Delta G_{silvestre} - \Delta G_{mutante}$]; B = es el valor del Δ(ΔG) corregido y corresponde a los valores del Δ(ΔG) experimental divididos entre la fracción oculta del resíduo, considerando que éste estuviera oculto en un 100%; C = es la división del valor corregido del Δ(ΔG) entre el número de $-CH_3$, $=CH_2$ y $\equiv CH$ que se pierden como resultado de la mutación. Cabe hacer notar que un valor positivo para el Δ(ΔG) significa que la proteína silvestre es más estable que la mutante. D = Nucleasa de *Staphylococcus* (3). E = Proteína del gen 5 del bacteriofago f1 (4). F = Barnasa (5, 6). G = Lisozima del fago T4 (7, 8). H = Inhibidor 2 de la quimotripsina (9). I = Rnasa T1 (1).

no (por ejemplo Tyr →Phe), o con una interacción hidrofóbica (por ejemplo Ile → Val) y luego determinar el valor de la estabilidad (ΔG) tanto para la proteína mutante como para la silvestre. Posteriormente se calcula la diferencia en la estabilidad de estas proteínas (Δ(ΔG)), y del resultado se interpreta en términos de la contribución de esa interacción específica en el plegamiento y en la estabilidad de la proteína silvestre en el estado nativo. El valor de los parámetros termodinámicos (ΔG y Δ(ΔG), por ejemplo) se puede obtener por medio de la desnaturalización térmica o química de la proteína (2).

II. EL EFECTO HIDROFÓBICO

El estudio del efecto hidrofóbico se simplifica al involucrar sólo a aquellas mutantes en donde el residuo del aminoácido original se reemplaza por uno de menor volumen, de tal manera que se elimina, en lo posible, la contribución del efecto estérico.

En la Tabla I se muestran los valores del Δ(ΔG) para 105 mutantes hidrofóbicas (Leu → Gly, Leu → Ala, Val → Gly, Val → Ala, Met → Gly, Met → Ala, Phe → Gly, Phe → Ala, Ile → Gly, Ile → Ala, Ile → Val) en seis proteínas diferentes: la nucleasa de *Staphylococcus* (3), la proteína codificada por el gen 5 del bacteriofago f1 (4), la barnasa (5, 6), la lisozima del fago T4 (7, 8), el inhibidor 2 de la quimiotripsina (9) y la ribonucleasa-T1 (1).

Asimismo, se muestra el porcentaje del área oculta (% oculto) de cada residuo de aminoácido reemplazado en la proteína silvestre, que sirve para corregir el Δ(ΔG) observado experimentalmente ($\Delta(\Delta G)_{obs}$) y ob-

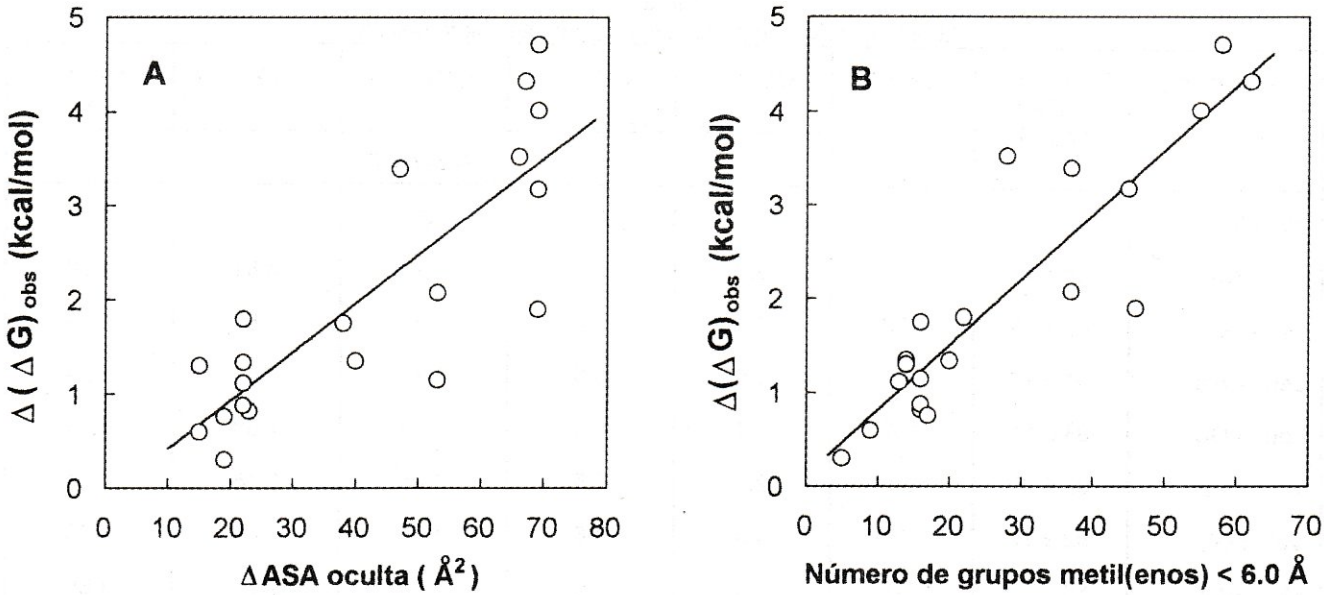


Figura 1. A) Dependencia del Δ(ΔG) con respecto al área de superficie accesible al solvente que esta oculta en la proteína mutante en el estado nativo. La línea muestra el mejor ajuste de los datos a la ecuación de una recta ($r = 0.82$; $b = -0.093$ kcal/mol y $m = 0.051$ kcal/mol/Å^2). B) Dependencia del Δ(ΔG) con respecto a la polaridad del microambiente de la mutación, expresado como el número de grupos metil(enos) dentro de un radio de 6 Å que rodean al residuo de aminoácido reemplazado. La línea muestra el mejor ajuste de los datos al modelo de una recta ($r = 0.87$; $b = 0.127$ kcal/mol y $m = 0.069$ kcal/mol/grupos metil). Adaptada de Serrano y cols (6).

tener un valor de $\Delta(\Delta G)_{corr}$ que considera al residuo reemplazado como si se encontrara 100 % oculto en el interior de la proteína. Aunque esta corrección es solo una aproximación, ya que la accesibilidad del residuo en las mutantes generalmente se desconoce, los estudios espectroscópicos sugieren que la estructura de las proteínas silvestres y las mutantes no se modifica significativamente. En este sentido, en la figura 1A se muestra que el valor del $\Delta(\Delta G)_{obs}$ para las mutantes hidrofóbicas aumenta con respecto al incremento del área hidrofóbica oculta en la proteína en estado nativo. Por tal motivo, al comparar a las mutantes hidrofóbicas se debe realizar la corrección de la accesibilidad de cada residuo de aminoácido mutado. Esta corrección aumenta el valor experimental del Δ(ΔG) entre un 10 y un 20 % (Tabla I).

Por otra parte, el reemplazo de un residuo de aminoácido por uno de menor tamaño provoca la pérdida de grupos metilo o metileno. En la mutación Ile → Val se remueve un solo grupo -CH_2-, que tiene un volumen de ≃27 Å^3 (1 Å = 0.1 nm), por lo que se esperaría que en esta mutante exista una cavidad de aproximadamente el mismo volumen. En este sentido, el grupo de Matthew, al estudiar el plegamiento de la lisozima del fago T4, sugirió que al formarse una cavidad en la mutante por la pérdida de un grupo, permite que algunos de los átomos vecinos se desplacen hacia el espacio vacío, pero que aún con estos movimientos, la cavidad permanece intacta entre un 80 y 90% (7). Este grupo también mostró que el valor del $\Delta(\Delta G)_{obs}$ se hace más negativo al incrementarse el volumen de la cavidad (Fig 2A), lo que indica una pérdida en las interacciones de van der Waals presentes en la proteína silvestre.

La existencia de una relación casi lineal entre el incremento del volumen de la cavidad en el interior de la mutante y el aumento en el Δ(ΔG) (Fig 2) sugiere una relación entre el Δ(ΔG) y el número de los grupos metilo o metileno que se pierde como resultado de la mutación (Tabla I). Como se observa, el valor del $\Delta(\Delta G)_{corr}$ por cada grupo metilo o metileno para las mutantes Ile → Val es de 1.1 ± 0.5 kcal/mol, lo que sugiere que la pérdida de un solo -CH_2- disminuye la estabilidad de la mutante con respecto a la silvestre.

Para el resto de la mutantes el valor promedio del $\Delta(\Delta G)_{corr}$ para cada uno de los grupos >CH-, > -CH_2 o -CH_3 es muy similar al valor de la mutante Ile →

Tabla II
Caracterización energética de 105 mutantes hidrofóbicas

Mutación	% oculto resíduo original	ΔV (A^3)	$\Delta(\Delta G)_{obs}$	$\Delta(\Delta G)_{corr}$	$\Delta(\Delta G)_{corr}$ / $-CH_n-$	$-\Delta G_{trans}$	$-\Delta G_{trans}$ / $-CH_n-$
			(kcal/mol)				
Ile → Val	89 ± 15	26	1.0	1.1	1.10	1.36	1.36
Ile → Ala	89 ± 15	76	3.0	3.4	1.10	3.84	1.28
Ile → Gly	89 ± 15	102	4.7	5.4	1.35	4.85	1.21
Leu → Ala	94 ± 11	75	3.5	3.5	1.17	3.87	1.29
Leu → Gly	94 ± 11	102	4.4	4.8	1.20	4.88	1.22
Val → Ala	92 ± 27	50	2.3	2.5	1.25	2.48	1.24
Val → Gly	92 ± 27	75	4.3	4.6	1.54	3.49	1.16
Met → Ala	83 ± 21	78	2.5	3.0	1.50	2.77	1.39
Met → Gly	83 ± 21	104	3.4	4.2	1.40	3.78	1.26
Phe → Ala	89 ± 17	112	3.4	3.8	0.63	4.00	0.67
Phe → Gly	89 ± 17	120	5.2	6.3	0.90	5.02	0.71
		Promedio ± DE	3.5± 1.2	3.9 ± 1.4	1.2 ± 0.3	3.7 ± 1.1	1.2 ± 0.2

El valor del ΔV es basado en (10); Los valores promedio del $\Delta(\Delta G)_{obs}$ y del $\Delta(\Delta G)_{corr}$ son de la Tabla I; el valor de $\Delta(\Delta G)_{trans}$ se determinó por la transferencia desde el agua → *n*-octanol (11) y se corrigió por la diferencia en el volumen entre los solutos y el solvente de acuerdo a (13). $\Delta(\Delta G)_{corr}$ /$-CH_n-$ y $\Delta(\Delta G)_{trans}$/$-CH_n-$ corresponde a la relación entre los diferentes Δ(ΔG) y el número de grupos $-CH_3$, $=CH_2$ y $\equiv CH$ que se pierden como resultado de la mutación. DE = desviación estándar de la media.

Val (Tabla I), y oscila entre 0.63 y 1.54, con un promedio general de 1.2 ± 0.3 kcal/mol (Tabla II). Es interesante que para la nucleasa de *Staphylococcus* (Tabla I), las mutaciones Val 111 → Ala y Val 114 → Ala tengan valores extremos de $\Delta(\Delta G)_{corr}$ por cada grupo $-CH_2-$ (2.4 y 0.0 kcal/mol, respectivamente), y que en su disposición tridimensional en la estructura de la proteína estos residuos estén próximos entre sí; este es un buen ejemplo para demostrar que el mismo tipo de mutación puede tener diferentes efectos en la estabilidad de la proteína dependiendo de su localización tridimensional.

En este sentido, los resultados del grupo de Fersht (6) apoyan la hipótesis de que la polaridad del ambiente que rodea a la mutación puede afectar los valores del $\Delta(\Delta G)_{obs}$ en las mutantes hidrofóbicas. Como se observa en la figura 1B, hay una relación entre el $\Delta(\Delta G)_{obs}$ y el ambiente hidrofóbico que rodea a la mutación, expresado como el número de grupos metilo o metileno que se encuentran en un radio menor a 6 Å del residuo reemplazado.

Por otra parte, el cálculo original de la contribución del efecto hidrofóbico en la estabilidad proteica se basó en los valores de la energía libre de transferencia (ΔG_{trans}) de diferentes compuestos que se usaron como modelo de los aminoácidos. El ΔG_{trans} se obtuvo a partir del coeficiente de reparto de estas sustancias entre el agua y diversos líquidos no polares que se emplearon para representar el interior de las proteínas, tales como el etanol, el hexano, el *n*-octanol, la N-metilacetamida y el ciclohexano (11).

Al analizar la escala del ΔG_{trans}, Sharp y cols (12, 13) demostraron que con el n-octanol se obtiene una mejor correlación entre los valores experimentales del Δ(ΔG) y el ΔG_{trans}. Cuando los datos experimentales se corrigen por la accesibilidad del residuo, la correlación mejora (Tabla II y Fig 2B). De hecho, cuando el volumen de la cavidad en el interior de la lisozima del fago T4 tiende a cero (Fig 2A), la magnitud del $\Delta(\Delta G)_{obs}$

Tabla III

Valores del Δ(ΔG)para las mutantes en los puentes de hidrógeno de diferentes proteínas

Proteína	Residuo	% oculto	Nº PH[A]	Δ(ΔG) (kcal/mol) Obs[B]	Corr[C]	Por PH[D]	Obs[B]	Corr[C]	Por PH[D]
				Asn → Asp			Asn → Ala		
RN-T1[E]	9	66	1				0.8	1.6	1.6
	36	28	1				0.0	0.3	0.3
	44	81	3				2.0	3.0	1.0
	81	100	3				2.9	4.2	1.4
Barnasa[F]	5	68	1				1.9	2.7	2.7
	23	94	2				2.3	3.4	1.7
	41	93	2	2.6	2.4	1.2			
	58	85	3	-0.3	-0.5	-0.1	2.7	3.9	1.3
	77	56	1				1.7	2.4	2.4
	84	71	4				2.0	2.8	0.7
Nucleasa[G]	100	100	2				4.6	5.8	2.9
	118	96	2				1.6	2.8	1.4
	119	77	1				0.8	1.7	1.7
	138	68	1				0.9	1.7	1.7
Promedio ± DE		77 ± 20	1.9±0.9	1.2±2.1	1.0±2.0	0.5±0.9	1.9±1.2	2.8±1.4	1.6±0.7
				Thr → Val			Thr → Cys		
Nucleasa[G]	22	86	1	0.9	2.0	2.0	0.9	2.4	2.4
	41	100	2	-0.8	0.5	0.3	-0.6	1.2	0.6
	44	82	2	-0.1	1.0	0.5	0.2	1.6	0.8
	62	100	2	0.2	1.5	0.8	1.1	2.9	1.4
	120	66	2	1.8	2.7	1.3	1.7	2.9	1.4
Barnasa[F]	99	99	5	2.9	4.2	0.8			
	105	13	1	2.1	2.3	2.3			
Proemdio ± DE		78±31	2.1±1.3	1.0±1.3	2.0±1.2	1.14±0.8	0.7±0.9	2.2±0.8	1.3±0.7
				Thr → Ala			Thr → Gly		
Barnasa[F]	6	33	1	2.0	2.0	2.0	0.6	0.5	0.5
	26	51	1	1.7	1.7	1.7	1.0	0.8	0.8
Promedio ± DE		42±13	1.0±0.0	1.8±0.2	1.9±0.2	1.9±0.2	0.8±0.3	0.7±0.2	0.7±0.2
				Thr → Arg			Thr → Ser		
Barnasa[F]	16	16	1	-0.7	-1.0	-1.0	1.4	1.3	1.3
Nucleasa[G]	22	86	1				0.6	0.2	0.2
	41	100	2				1.1	1.4	0.7
	44	82	2				0.0	-0.3	-0.2
	62	100	2				2.1	1.7	0.9
	120	66	2				0.6	0.3	0.2
Promedio ± DE		75±32	1.7±0.5	-0.7	-1.0	-1.0	1.0±0.7	0.8±0.8	0.5±0.5

(-1.9 kcal/mol) es igual al valor de la diferencia del ΔG_{trans} entre la Leu (2.32 kcal/mol) y la Ala (0.42 kcal/mol) cuando se utiliza el coeficiente de reparto entre el agua y el n-octanol (Tabla I del apéndice). Esto indica que cuando una proteína se pliega, su interior está bien empacado y las cavidades de gran volumen son poco frecuentes (14). Estos resultados sugieren que los valores del ΔG_{trans} que se obtuvieron con el *n*-octanol, se pueden emplear para calcular la ganancia en la estabilidad estructural al ocultarse las cadenas hidrofóbicas en el interior de las proteínas.

Tabla III (continuación)
Valores del Δ(ΔG)para las mutantes en los puentes de hidrógeno de diferentes proteínas

Proteína	Residuo	% oculto	Nº PH[A]	Δ(ΔG) (kcal/mol) Obs[B]	Corr[C]	Por PH[D]	Obs[B]	Corr[C]	Por PH[D]
				Asp → Asn			Asp → Ala		
Barnasa[F]	8	10	1				0.9	1.0	1.0
	12	25	2				0.4	0.8	0.4
	54	73	1	1.8	2.0	2.0	2.9	3.9	3.9
Promedio ± DE		36±33	1.3±0.6	1.8	2.0	2.0	1.4±1.3	1.9±1.8	1.8±1.8
				Tyr → Leu			Tyr → Phe		
Barnasa[F]	24	79	1				-0.1	0.8	0.8
	78	88	2				1.1	2.1	1.1
	103	55	2				0.2	0.8	0.4
RN-T1[E]	11	99	1				2.1	3.2	3.2
	42	98	1				-1.2	-0.04	-0.04
	56	90	1				0.8	1.8	1.8
	57	85	1				0.5	1.4	1.4
	68	99	1				1.4	2.5	2.5
Nucleasa[G]	27	78	1				0.6	1.5	1.5
	54	75	1	3.4	4.2	4.2	0.0	1.4	1.4
	85	35	1	0.1	0.5	0.5	0.0	0.4	0.4
	91	100	2	3.9	4.9	2.5	2.4	3.6	1.8
	93	90	1	4.5	5.4	5.4	2.0	3.0	3.0
	113	81	1	-0.2	0.6	0.6	0.0	0.9	0.9
	115	40	1	0.3	0.7	0.7	0.1	0.6	0.6
Promedio ± DE		80±21	1.2±0.4	2.0±2.1	2.7±2.4	2.3±2.1	0.7±0.9	1.6±1.1	1.4±0.9
				Arg → Ala			Ser → Ala		
Barnasa[F]	91	98	2				2.4	2.9	1.4
	92	43	1				3.2	3.4	3.4
	110	18	3	-0.1	-0.1	-0.03			
RN-T1[E]	12	54	2				1.2	1.4	0.7
	17	26	1				-0.6	-0.3	-0.3
	64	53	1				1.5	1.8	1.8
Promedio ± DE		49±28	1.7±0.8	-0.1	-0.1	-0.02	1.5±1.4	1.8±1.4	1.4±1.3

A = Número de puentes de hidrógeno que forma cada residuo en la proteína silvestre en el estado nativo. B = es el valor del Δ(ΔG) determinado experimentalmente [$\Delta(\Delta G) = \Delta G_{silvestre} - \Delta G_{mutante}$]. C = es el valor del Δ(ΔG) corregido y fue calculado como sigue: $\Delta(\Delta G)_{corr} = \Delta(\Delta G)_{obs}$ + [(% oculto) x (diferencia en la hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos involucrados, obtenido de la tabla II del apéndice)]. D = es el valor del $\Delta(\Delta G)_{corr}$ dividido entre el número de puentes de hidrógeno que se pierden por la mutación. E = ribonucleasa-T1 (16). F = Barnasa (6). G = Nucleasa (3). DE = desviación estándar de la media.

El conjunto de estas evidencias muestra que cada grupo -CH_2- que se oculta en el interior de la proteína durante el plegamiento contribuye con 1.2 ± 0.3 kcal/mol a la estabilidad conformacional del estado nativo de las proteínas (Tabla II).

III. LOS PUENTES DE HIDRÓGENO INTRAMOLECULARES

Cuando una proteína se pliega, muchos de los grupos polares se deshidratan completamente para formar puentes de hidrógeno intramoleculares en el interior proteico. Con esto, las proteínas aumentan su estabilidad, pero también pierden energía al deshidratar y ocultar a los diferentes grupos polares.

Con las mutantes en los puentes de hidrógeno se determina la ganancia energética de un grupo polar que interactúa por medio de un puente de hidrógeno con el agua en el estado desnaturalizado (D), pero que en el estado nativo (N) se deshidrata para formar un puente de hidrógeno intramolecular.

Tabla IV
Caracterización energética de 69 mutantes en los puentes de hidrógeno

Mutación	N° PH	$\Delta(\Delta G)_{obs}$	$\Delta(\Delta G)_{corr}$	$\Delta(\Delta G)_{corr}$ /PH
		(kcal/mol)		
Asn → Asp	1.9	1.2	1.0	0.5
Asn → Ala	1.9	1.9	2.8	1.6
Asp → Ala	1.3	1.4	1.9	1.8
Asp → Asn	1.3	1.8	2.0	2.0
Thr → Val	2.1	1.0	2.0	1.2
Thr → Cys	2.1	0.7	2.2	1.3
Thr → Ala	1.0	1.8	1.9	1.9
Thr → Gly	1.0	0.8	0.7	0.7
Thr → Arg	1.0	-0.7	-1.0	-1.0
Thr → Ser	1.7	1.0	0.8	0.5
Tyr → Leu	1.2	2.0	2.7	2.3
Tyr → Phe	1.2	0.7	1.6	1.4
Arg → Ala	3.0	-0.1	-0.1	-0.03
Ser → Ala	1.7	1.5	1.8	1.4
Promedio ± DE		1.1 ± 0.8	1.5 ± 1.1	1.2 ± 0.9

A = Promedio del número de puentes de hidrógeno que se pierden por la mutación. Los valores promedio del $\Delta(\Delta G)_{obs}$ y $\Delta(\Delta G)_{corr}$ son de la tabla III. $\Delta(\Delta G)_{corr}$ /PH corresponde a la relación entre los valores del $\Delta(\Delta G)_{corr}$ y el número de puentes de hidrógeno. DE = desviación estándar de la media.

En el estado N se forman 1.1 puentes de hidrógeno por residuo. En general, los puentes de hidrógeno que se forman entre los átomos de los enlaces peptídicos (>C=O···H-N<) son los más abundantes, cerca del 68.1%; la interacción entre el grupo carbonilo del enlace peptídico y las cadenas laterales de los residuos de aminoácido (>C=O···R-) constituyen el 10.9% de los puentes de hidrógeno; la interacción entre el gru-po amino del enlace peptídico y las cadenas laterales (>N-H···R-) aportan el 10.4%, y por último, los puentes de hidrógeno formados entre las cadenas laterales (-R···R-) aportan el 10.6% restante del total de los puentes de hidrógeno intramoleculares que hay en una proteína en el estado N.

La Tabla III muestra el $\Delta(\Delta G)$ de 69 mutantes obtenidas con tres diferentes proteínas: la ribonucleasa-T1 (1), la barnasa (5, 6) y la nucleasa de *Staphylococcus* (3). Se observa que el área oculta al solvente (% oculto) de los residuos de aminoácido involucrados en los puentes de hidrógeno en las proteínas silvestres es menor que la de los residuos hidrofóbicos (Tabla I), lo que indica que están poco ocultos en el interior de la proteína. También se observa que el número de puentes de hidrógeno que pueden formar los diferentes residuos de aminoácido varía entre 1 y 5, dependiendo del tipo de residuo y de su posición tridimensional en la proteína silvestre. Asimismo, se muestra el valor del $\Delta(\Delta G)$ observado experimentalmente. En la mayoría de los casos, el valor de este parámetro fue positivo, los que indica que la proteína mutante fue menos estable que la silvestre, a pesar de que el nuevo residuo sea más hidrofóbico que el original.

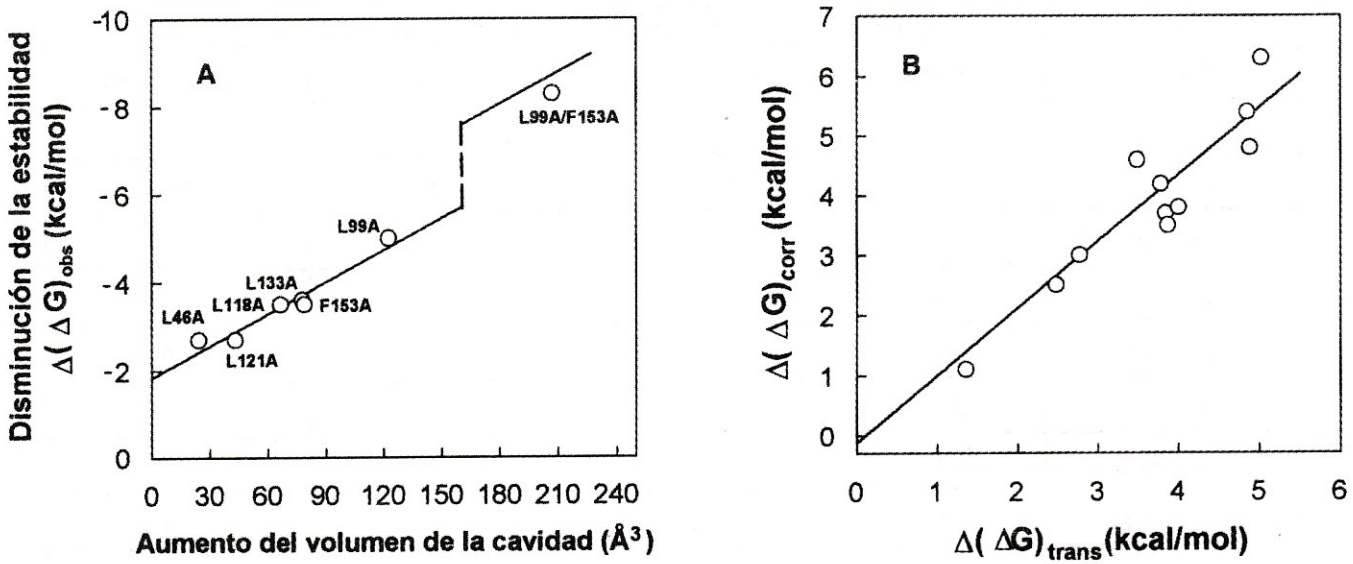


Figura 2. A) Dependencia del Δ(ΔG) de una serie de mutantes sencillas de la lisozima del fago T4 (Leu → Ala; Phe → Ala) y una doble mutante (Leu → Ala/Phe → Ala), con respecto al volumen de la cavidad creada por el reemplazo del o los residuos de aminoácido originales. La línea muestra el mejor ajuste de los datos al modelo de una recta ($r = 0.98$; $b = -1.9$ kcal/mol y $m = -0.024$ kcal/mol/Å^3). Es importante hacer notar que el valor de la ordenada al origen es igual a la diferencia del ΔG_{trans} entre la Ala y la Leu cuando se calcula su coeficiente de reparto entre el agua y el *n*-octanol (tabla I del apéndice). Para el ajuste al modelo de la recta de la doble mutante, se empleó un valor para la ordenada al origen superior en -1.9 kcal/mol, lo que refleja que tanto la Leu como la Phe han sido sustituidas por Ala. Los autores calcularon el $\Delta(\Delta G) = \Delta G_{mutante} - \Delta G_{silvestre}$, por lo que los valores más negativos indican una menor estabilidad para la mutante. Adaptado de Eriksson y cols (7). B) Dependencia del $\Delta(\Delta G)_{corr}$ con respecto al $\Delta(\Delta G)_{trans}$. La línea muestra el ajuste de los datos al modelo de una recta ($r = 0.93$; $b = 0.362$ kcal/mol y $m = 0.891$). Los datos fueron tomados de la Tabla II.

Esto puede sugerir que la pérdida de un puente de hidrógeno contribuye más al valor del $\Delta(\Delta G)_{obs}$ que el aumento en el efecto hidrofóbico ocasionado por la mutación. Sin embargo, para calcular el aporte energético del puente de hidrógeno en el valor del $\Delta(\Delta G)_{obs}$, es necesario incluir la contribución de la diferencia en la hidrofobicidad originada con la mutación. Esta corrección consiste en adicionar al $\Delta(\Delta G)_{obs}$ el producto de la diferencia de las hidrofobicidades del aminoácido sustituto y el original (Tabla II del Apéndice), por la fracción de la superficie oculta del aminoácido original en la proteína silvestre (Tabla III). Con esto, el valor del Δ(ΔG) aumenta de 1.1 a 1.5 kcal/mol (Tabla IV).

El valor del Δ(ΔG) varía dependiendo de las características del puente de hidrógeno, tales como el ángulo y la longitud de enlace, los grupos participantes, su microambiente y su localización tridimensional en la proteína. Asimismo, hay que considerar lo que ocurre con aquellos residuos de los aminoácidos que forman parte del puente de hidrógeno y que aún se conservan en la proteína mutante. En este sentido, el mejor de los casos es cuando el residuo de aminoácido que permanece, interactúa con una molécula de agua cuando la proteína se encuentra en el estado N. En este caso, el valor del $\Delta(\Delta G)_{obs}$ depende sólo del número de puentes de hidrógeno que se perdieron con la mutación y puede dar cierta información al respecto. Por otro lado, si el residuo de aminoácido forma un nuevo puente de hidrógeno intramolecular, el valor esperado para el Δ(ΔG) será de cero; pero si el residuo queda desapareado, entonces se esperaría un valor negativo para el Δ(ΔG), ya que con la proteína en el estado D se formarían nuevos puentes de hidrógeno con el agua. En estas últimas situaciones sería muy difícil obtener alguna información sobre la participación del puente de hidrógeno en la estabilidad de la proteína silvestre.

Los datos de la Tabla III, muestran que el $\Delta(\Delta G)_{corr}$ solo presenta 6 valores negativos, mientras que el resto tiene valor positivo. La relación entre el $\Delta(\Delta G)_{corr}$ y el número de puentes que forma cada residuo es de 1.2 ±

0.9 kcal/mol (Tablas III y IV), lo que significa que por cada puente de hidrógeno intramolecular en el estado N se gana 1.2 kcal/mol en la estabilidad de la proteína.

En este sentido, Blaber y cols (15), determinaron que en la mutante Val 149 → Thr de la lisozima del fago T4 la Thr no forma ningún puente de hidrógeno y la estabilidad disminuye en 2.8 kcal/mol. En otras dos mutantes semejantes se forma un puente de hidrógeno y la disminución de la estabilidad es de 1.6 y 1.3 kcal/mol, respectivamente. Si se toma en cuenta la diferencia en la accesibilidad y la hidrofobicidad, los resultados sugieren que cada puente de hidrógeno adicional en las mutantes aporta ≃1.2 kcal/mol a la estabilidad de la proteína. Este es un resultado que apoya el análisis descrito en el presente trabajo.

Estos estudios subrayan el hecho de que al plegarse una proteína se pierde estabilidad al ocultarse los diferentes grupos polares, pero se compensa por la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares.

IV. COMPENSACIÓN DE FUERZAS EN EL PLEGAMIENTO Y LA ESTABILIDAD DE LA RIBONUCLEASA-T1

La ribonucleasa-T1 es una proteína de 104 residuos de aminoácidos con un solo dominio estructural, cuya estabilidad conformacional es de 9 kcal/mol a pH de 4.5 y a 25°C (1). La estabilidad conformacional de las proteínas es el resultado de la compensación entre la fuerza estabilizadora y la desestabilizadora del estado nativo.

Para el caso de la ribonucleasa-T1, Pace y cols (1) han descrito ambos tipos de fuerzas. La desestabilizadora está constituida por la entropía conformacional = (104 residuos)(-1.7 kcal/mol) = -177 kcal/mol; la energía necesaria para ocultar a los enlaces peptídicos = (73.4 enlaces peptídicos)(-1.1 kcal/mol) = -81 kcal/mol; la energía necesaria para ocultar los grupos polares = (el número de grupos polares)(ΔG_{trans} de cada grupo, obtenido de la tabla I del apéndice) = -28 kcal/mol. La suma de estas contribuciones es igual a -286 kcal/mol, y corresponde a la fuerza desestabilizadora del estado nativo.

Por otra parte, la fuerza estabilizadora está constituida por el efecto hidrofóbico = (número de cadenas laterales hidrofóbicas, incluyendo a los grupos -CH_2- de los residuos polares cargados o no)(1.2 kcal/mol) = 165 kcal/mol; la energía de los puentes de hidrógeno intramoleculares = (104 puentes intramoleculares)(1.2 kcal/mol) = 125 kcal/mol. Lo que es igual a +290 kcal/mol, y corresponde a la fuerza estabilizadora del estado nativo.

La suma de estas fuerzas proporciona un ΔG teórico = -286 kcal/mol + 290 kcal/mol = 4 kcal/mol; que es comparable con el valor experimental del ΔG = 9 kcal/mol. Cabe aclarar que el análisis realizado en este trabajo se basa en resultados experimentales de la literatura y que el hecho de que el valor teórico de la estabilidad esté en el mismo orden de magnitud que el experimental, indica que las estimaciones y correcciones realizadas son confiables.

Lo anterior sugiere que el efecto hidrofóbico y los puentes de hidrógeno intramoleculares son las fuerzas principales que dirigen el plegamiento de las proteínas y que estabilizan su conformación, lo que proporciona una nueva visión del fenómeno, contraria a lo que se ha publicado en algunos excelentes libros de bioquímica, tales como el escrito por Voet y Voet en 1995 (17). Asimismo, el conocer la contribución energética de los distintos tipos de interacciones que existen en las proteínas nativas, permitirá abrir nuevas perspectivas en el quehacer humano. Por ejemplo, se podrá diseñar proteínas con una mayor resistencia a los procesos de desnaturalización obteniendo mejores catalizadores industriales, o en el campo de la medicina, al explorar nuevas vías en la terapia génica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, proyectos IN202496 e IN200399 y por el CONACyT, proyecto 26096M. OFH es estudiante del Doctorado en Investigación Biomédica Básica de la UACPyP de la UNAM.

REFERENCIAS

1. Pace CN, Shirley BA, McNutt M y Gajiwala K (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins. FASEB J *10*:75-83.

2. Flores-Herrera O, Uribe A, Rendón JL, Pardo JP y Martínez F (1999)Análisis termodinámico del efecto de las mutaciones en el plegamiento de las proteínas. Bol Educ Bioq *18*:66-75.

3. Shortle D, Stites WE y Meeker AK (1990) Contributions of the large hydrophobic amino acids to the stability of staphylococcal nuclease. Biochemistry *29*:8033-8041.

4. Sadberg WS y Terwilliger TC (1991) Energetics of repacking a protein interior. Proc Nat Acad Sci USA *88*:1706-1710.

5. Kellis JT, Nyberg K y Fersht AR (1989) Energetics of complementary side-chain packing in a hydrophobic core. Biochemistry *28*:49144922.

6. Serrano L, Kellis JT, Cann P, Matouschek A y Fersht AR (1992) The folding of an enzyme II. Substructure of barnase and the contributions of different interaction to protein stability. J Mol Biol *224*:783.

7. Erikson AE, Baase WA, Zhang X-J, Heinz DW, Blaber M, Baldwin EP y Matthews BW (1992) The response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relationship to the hydrophobic effect. Science *255*:178.

8. Matsumura M, Becktel WJ y Matthews BW (1988) Hydrophobic stabilization in T4 lysozyme determined directly by multiple substitutions of Ile3. Nature *334*:406-410.

9. Jackson S, Moracci M, elMasry N, Johnson CN y Fersht AR (1993) Effect of cavity-creating mutations in the hydrophobic core of chymotrypsin inhibitor 2. Biochemistry *32*:11259.

10. Harpaz Y, Gerstein M y Chotia C (1994) Structure *2*:641.

11. Fauchere JL y Pliska VE (1983) Hydrophobic parameters of amino-acid side-chain from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides. Eur J Med Chem *18*:369-375.

12. Sharp KA, Nicholls A, Fine RF y Honing B. (1991a) Reconciling the magnitude of the microscopic and macroscopic hydrophobic effect. Science *252*:106-109.

13. Sharp KA, Nicholls A, Friedman R y Honing B (1991b) Extracting hydrophobic free energies from experimental data: relationship to protein folding and theoretical models. Biochemistry *30*: 9686-9697.

14. Richards FM (1977) Areas, volumes, packing and protein structure. Annu Rev Biophys Bioeng *6*:151-176.

15. Blaber M, Lindstrom JD, Gassner N, Xu J, Heinz DW y Matthews BW (1993) The energetics cost and the structural consequences of burying a hydroxyl group within the core of a protein determined from Ala → Ser and Val → Thr substitutions in T4 lysozyme. Biochemistry *32*:11363-11373.

16. 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.

17. Voet D y Voet JG (1995) Biochemistry, 2a edición, pp 176. John Wiley & Sons, Somerset, N.J.

APENDICE Tabla I

Valores del ΔG de transferencia (ΔG_{trans}) para las cadenas laterales de los aminoácidos en diferentes solventes orgánicos

Residuo	ΔG_{trans} (kcal/mol)			
	Nozaki y Tanford[A] (agua → etanol, dioxano)	Fauchere y Pliska[B] (agua → *n*-octanol)	Damodaran y Song[C] (agua → N-metilacetamida)	Radzika y Wolfenden[D] (agua → ciclohexano)
Trp	3.4	3.07	4.27	2.33
Ile	1.8	2.46	2.29	4.92
Phe	2.5	2.44	3.02	2.98
Leu	1.8	2.32	2.55	4.92
Met	1.3	1.68	2.32	2.35
Val	1.5	1.66	1.69	4.04
Cys	1.0	2.10	1.29	1.29
½ Cys	1.0	1.34	--	--
Tyr	2.3	1.31	3.58	-0.40
Pro	1.4	0.98	--	--
Ala	0.5	0.42	0.67	1.81
Thr	0.4	0.35	0.77	-2.57
His	0.5	0.18	0.66	-4.66
Gly	0.0	0.00	0.0	0.94
Ser	-0.3	-0.05	0.53	-3.40
Gln	-0.2	-0.30	0.21	-5.54
Asn	-0.2	-0.82	1.36	-6.64
Glu	-2.5	-0.87	1.90	-6.81

APENDICE Tabla I (Continuación)

Valores del ΔG de transferencia (ΔG_{trans}) para las cadenas laterales de los aminoácidos en diferentes solventes orgánicos

Residuo	ΔG_{trans} (kcal/mol)			
	Nozaki y Tanford[A] (agua → etanol, dioxano)	Fauchere y Pliska[B] (agua → *n*-octanol)	Damodaran y Song[C] (agua → N-metilacetamida)	Radzika y Wolfenden[D] (agua → ciclohexano)
Asp	-2.5	-1.05	2.39	-8.72
Lys	-3.0	-1.35	1.24	-5.55
Arg	-3.0	-1.38	0.62	-14.92
enlace peptíd.		-1.1		

A = Los valores para el Trp, Phe, Tyr, Leu, Val, Met, His, Ala, Thr y Ser son basados en la solubilidad de los aminoácidos en agua y en soluciones acuosas de etanol y dioxano a 25°C, pero extrapolados al 100 % de etanol o ciclohexano (Nozaki Y y Tanford C (1971) J Biol Chem *246*: 2211). El resto de los valores se estimaron como en (Levitt M (1976) J Mol Biol *104*:59)

B = Basados en los coeficientes de reparto de los N-acetil aminoácidos entre el n-octanol y el agua, a temperatura ambiente (Fauchere JL y Pliska V (1983) Eur J Med Chem *18*: 369).

C = Basados en la solubilidad de los aminoácidos en agua y en 100 % de N-metilacetamida, a 37°C (Damoradan S y Song KB (1986) J Biol Chem *261*:7220).

D = Basados en los coeficientes de reparto de compuestos similares a las cadenas laterales de los aminoácidos entre el agua y el cyclohexano, a 20°C (Radzika A y Wolfenden R (1988) Biochemistry *27*: 1644).

APÉNDICE Tabla II

Diferencia en la hidrofobicidad de los aminoácidos sustituídos en las diferentes porteínas en este estudio

Mutación	ΔG_{trans} (residuo sustituto) - ΔG_{trans} (residuo original) = diferencia en hidrofobicidad (kcal/mol)
Asn → Asp	(-1.05) - (-0.82) = -0.23
Asn → Ala	(0.42) - (-0.82) = 1.24
Asp → Ala	(0.42) - (-1.05) = 1.47
Asp → Asn	(-0.82) - (-1.05) = 0.23
Thr → Val	(1.66) - (0.35) = 1.31
Thr → Cys	(2.10) - (0.35) = 1.75
Thr → Ala	(0.42) - (0.35) = 0.07
Thr → Gly	(0.0) - (0.35) = -0.35
Thr → Arg	(-1.38) - (0.35) = -1.73
Thr → Ser	(-0.05) - (0.35) = -0.4
Tyr → Leu	(2.32) - (1.31) = 1.01
Tyr → Phe	(2.44) - (1.31) = 1.13
Arg → Ala	(0.42) - (-1.38) = 1.80
Ser → Ala	(0.42) - (-0.05) = 0.47

Los valores de ΔG_{trans} son los calculados por Fauchere y Pliska (1983), presentados en la tabla I de este apéndice.

BEB 19(3): 158-163

EL PAPEL DEL POTASIO DURANTE LA ISQUEMIA

Vicente Castrejón Téllez. Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-242, C P 04510, México, D.F., Tel: 56-22-56-32, Fax: 56-22-56-30. Correo electrónico: vcastrej@ifisiol.unam.mx

RESUMEN

Las mitocondrias de diferentes tejidos tienen canales específicos a K^+ que son similares a los canales de K^+ regulados por ATP (K_{ATP}) de la membrana plasmática. Estos canales mitocondriales son sensibles a los bloqueadores y activadores de canales K_{ATP}. Los canales K_{ATP} parecen participar en el mecanismo de precondicionamiento a la isquemia. Los activadores de canales K_{ATP} protegen al miocardio durante el proceso de isquemia-reperfusión. La protección se evita con bloqueadores de canales K_{ATP}. La modulación de los canales K_{ATP} durante la isquemia puede prevenir la muerte celular y por lo tanto tiene un gran potencial terapéutico.

PALABRAS CLAVE: Mitocondria, canales K_{ATP}, K^+, isquemia precondicionante, isquemia-reperfusión.

ABSTRACT

Mitochondria from different tissues possess potassium channels similar to the ATP regulated potassium channels (K_{ATP}) found in the plasma membrane. The mitochondrial channels are sensitive to blockers and activators of K_{ATP} channels. The K_{ATP} channels are thought to participate in the mechanism of preconditioning to ischemia. The K_{ATP} activators protect ischemic - reperfused myocardium. This protection is abolished by blockers of the K_{ATP} channels. Modulation of K_{ATP} channels during ischemia may prevent the cell death and has great therapeutic potential.

KEY WORDS: Mitochondria, K_{ATP} channels, K^+, preconditioning to ischemia, ischemia-reperfusion

GENERALIDADES DE LA ISQUEMIA

La isquemia consiste en una disminución en el aporte de oxígeno como resultado de una reducción en la perfusión sanguínea. La limitada disponibilidad de oxígeno (hipóxica o anoxia) evoca respuestas celulares compensatorias. De no restablecerse la disponibilidad de oxígeno, las células mueren. Sin embargo, una gran cantidad de estudios han demostrado que buena parte del daño celular asociado a la isquemia ocurre como resultado de la reperfusión y el súbito aumento en la disponibilidad de oxígeno.

En los humanos, el daño por isquemia en diversas células y tejidos es probablemente una de las principales causas de muerte. Las enfermedades cardiovasculares frecuentemente producen daño por isquemia e hipoxia en el corazón, el cerebro, el intestino, el riñón y el hígado. El conocimiento de las alteraciones que sufren las células durante la isquemia podría proveer información importante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En los organismos aerobios bajo condiciones limitantes de oxígeno, la demanda de glucosa aumenta incrementando la glucólisis anaerobia, al mismo tiempo se incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática y se eliminan los gradientes iónicos y eléctricos. Cuando un tejido sufre de insuficiencia de oxígeno, la fosforilación oxidativa mitocondrial es inhibida dando como resultado una caída en los niveles de ATP. Disminuyendo la mayoría de las funciones metabólicas celulares junto con la deficiencia en la producción de energía.

Para sobrevivir a la deficiencia de oxígeno, los organismos responden con cambios bioquímicos y fisiológicos como, la activación del flujo glucolítico y la estabilización de la permeabilidad membranal, probablemente mediante disminución de la actividad de los canales iónicos. La activación de la glucólisis provoca un decremento en los niveles de glucógeno y un aumento en los niveles de ácido láctico en el citosol, disminuyendo el pH intracelular (1).

FISIOLOGIA DE IONES EN LA ISQUEMIA

Fisiopatología del Ca^{2+}

El Ca^{2+} es un catión que en altas concentraciones actúa como una toxina celular (2). Durante la anoxia la

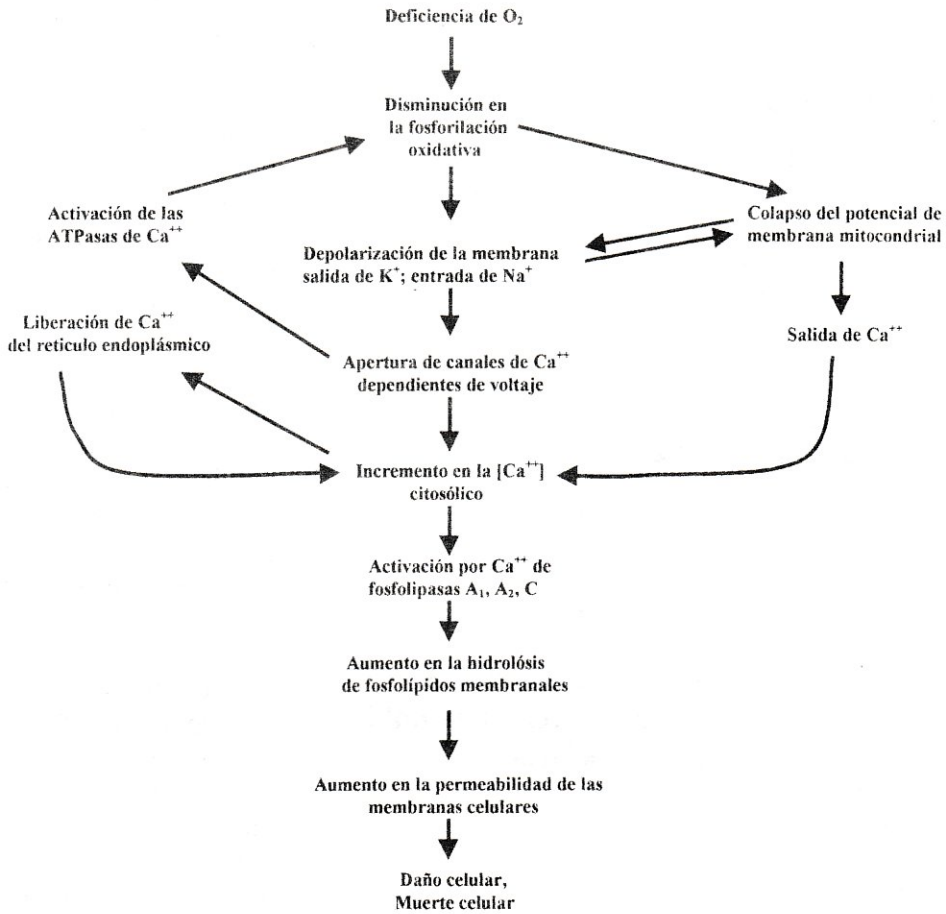


Figura 1. Principales eventos metabólicos que se presentan en células sensibles a la limitación de oxígeno. Desde las consecuencias energéticas durante la deficiencia de O_2 hasta el daño y muerte celular (1).

mitocondria aumenta de volumen y comienza a salir Ca^{2+} de la matriz acumulándose en el citoplasma. La membrana plasmática de la célula hinchada se hace más permeable, porque el Ca^{2+} activa fosfolipasas que digieren a los fosfolípidos de las membranas, permitiendo la salida de varias enzimas solubles, coenzimas y otros metabolitos hacia el espacio extracelular (3) (Fig 1).

El incremento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol induce las fosfolipasas A1, A2 y C cuya acción se ha considerado muy dañina bajo condiciones de anoxia. Un ejemplo en la participación de las fosfolipasas se observa en la actividad de la fosfolipasa C cuya función continua aún bajo condiciones limitantes de oxígeno lo que resulta en un decremento de los niveles de fosfatidil-inositol. La principal vía responsable de la formación y degradación del fosfatidil-inositol se ilustra en la figura 2. En respuesta a la movilización de Ca^{2+} intracelular se favorece la actividad de la fosfolipasa C sobre la degradación del fosfatidil-inositol-(4,5)-bifosfato [$PI(4,5)P_2$)] liberando diacilglicerol e inositol trifosfato (IP_3), que actúa como segundo mensajero y funciona como señal para la liberación de Ca^{2+} de diversas pozas intracelulares (1) (Fig 2).

Fisiopatología del K^+

El K^+ y el Na^+ juegan un papel muy importante en células de tejidos nerviosos y musculares, estos iones son transportados a través de canales iónicos específicos localizados en las membranas celulares. La distribución de estos iones a través de la membrana genera un equilibrio que resulta en un gradiente eléctrico. Existen células que son eléctricamente excitables y otras que no lo son, la diferencia entre estos tipos de células es que en las primeras, los canales presentes son sensibles a las diferencias de potencial eléctrico entre la superficie externa e interna de la membrana (canales dependientes de voltaje).

Durante la anoxia las células comienzan a hincharse debido a que no pueden mantener las concentraciones iónicas normales en su interior. En células cardiacas este cambio de volumen es provocado principalmente por un intercambio masivo de K^+ por la entrada de Na^+ parcialmente compensada por la salida de K^+ citoplásmico. La depleción de K^+ modifica el potencial de membrana plasmática activando diversos tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y disparando la entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma.

El K^+ no sólo afecta la célula a nivel de la membrana celular, también afecta en otros organelos, como la mitocondria. Por ejemplo, el flujo neto de K^+ a través de la membrana interna mitocondrial regula funciones importantes en la mitocondria; como son la fosforilación

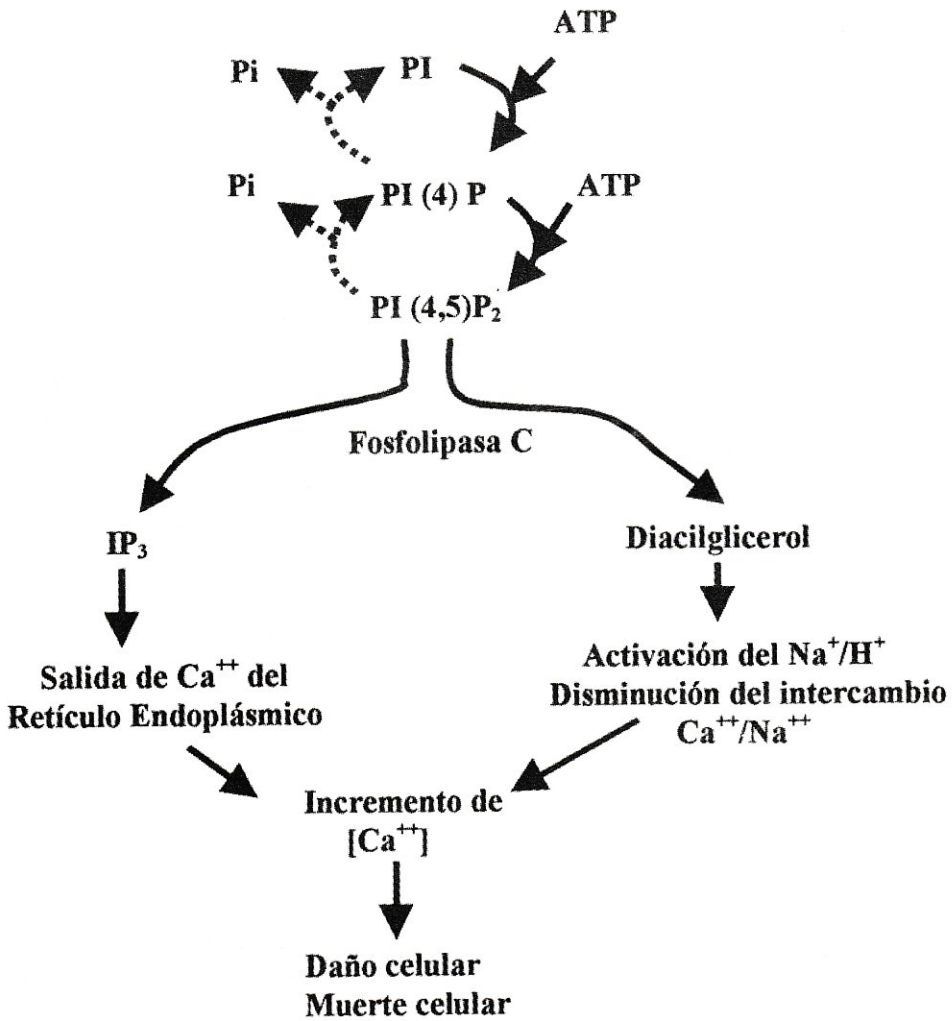


Figura 2. En condiciones limitantes de O_2 los niveles de fosfatidil inosiol (PI) disminuyen mientras que los de diacilglicerol aumentan. Por ejemplo como se ilustra para riñón. En condiciones normales el PI es fosforilado dos veces en las posiciones 4 y 5 del inositol hasta formar PI(4,5)Pi. El balance de PI(4,5)Pi se mantiene al convertirse nuevamente a PI. Durante la isquemia, en respuesta a un incremeto en la concentración de Ca^{2+} (representado como Ca^{++}) se activa la fosfolipasa C, enzima que actúa sobre PI(4,5)Pi, liberando diacilglicerol mas inisitol trifosfato (IP3) como segundo mensajero que señaliza la salida de Ca^{2+} de pozas intracelulares. Resultando en una cascada patogénica de Ca^{2+} que finaliza en el daño y muerte celular (1).

oxidativa y la homeostasis del Ca^{2+} celular (4).

MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Ca^{2+} y DE K^+

El transporte de Ca^{2+}

Las células de eucariotos presentan sistemas de transporte de Ca^{2+} en la membrana plasmática, en la mitocondria y en el retículo endoplásmico. Esos sistemas de transporte poseen diferentes propiedades cinéticas y son utilizados para regular la homeostasis del Ca^{2+} en la célula. La membrana plasmática contiene tres sistemas de transporte de Ca^{2+}: una ATPasa específica de Ca^{2+}, un canal de Ca^{2+} y un intercambiador Na^+/Ca^{2+}. La concentración de Ca^{2+} citoplasmico es alrededor de 10^{-7} M. En la mitocondria el Ca^{2+} entra utilizando la energía del gradiente electroquímico de protones, a través de un uniportador electroforético de Ca^{2+} inhibido por rojo de rutenio (5). La salida de Ca^{2+} se efectúa por un intercambiador Na^+/Ca^{2+}, diferente al de la membrana plasmática y un intercambiador Ca^{2+}/H^+ (Fig 3).

Se ha propuesto que la elevación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial aumenta la fosforilación oxidativa, por medio de la activación de deshidrogenasas sensibles a Ca^{2+} sin necesidad de bajar el cociente ATP/ADP y manteniendo la concentración de ATP citosólico (6). El efecto del Ca^{2+} es modificado por el Mg^{2+}, que inhibe competitivamente la entrada de Ca^{2+}, así como por el Na^+, que se intercambia por el Ca^{2+} de la mitocondria.

El transporte de K^+

Mucha de la energía de las células animales es utilizada para dirigir la entrada de K^+ y la salida de Na^+ a través de la membrana plasmática mediante la ATPasa de Na^+/K^+ de la membrana plasmática. A su vez, el K^+

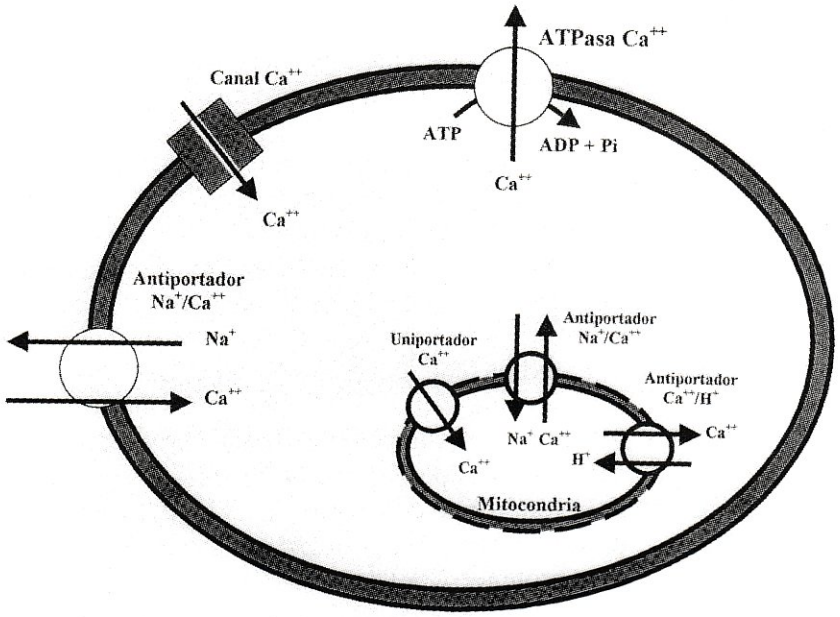


Figura 3. Sistemas de transporte de Ca^{2+} (representado como Ca^{++}) en la membrana celular y en la mitocondria.

Los canales iónicos son proteínas intrínsecas de membrana que pueden abrirse o cerrarse como resultado de cambios en el potencial transmembranal (canales dependientes de voltaje), o por agentes específicos que interaccionan con alguna proteína del canal (9).

En las células cardiacas existen mecanismos intrínsecos, que participan en la respuesta patofisiológica a la isquemia. Uno de los mecanismos que se presenta en respuesta a la isquemia es el incremento en la salida de K^+ del miocito y en consecuencia una disminución en el potencial de acción; este efecto se debe a la activación de un canal de alta conductancia a K^+ que se abre al disminuir los niveles de ATP. (10)

puede salir de la célula a través de canales específicos a K^+ localizados en la membrana plasmática (7) (Fig 4).

El K^+ es el catión más abundante en el citoplasma y la mitocondria; en la mitocondria, el K^+ alcanza un concentración de 100 a 120 mM. En las mitocondrias se ha descrito un antiportador K^+/H^+ que cataliza la salida del K^+ hacia el citosol, y un uniportador que transporta K^+ a la matriz mitocondrial (Fig 4). Estos dos sistemas en conjunto con el movimiento paralelo de aniones, como el fosfato, son responsables de la regulación de la acumulación del K^+ intramitocondrial (8).

CANALES K_{ATP} Y SU FUNCION DURANTE LA ISQUEMIA

El interés en los canales de K_{ATP} mitocondriales está creciendo debido a su posible participación en el metabolismo energético mitocondrial y a su posible relación con estados patológicos asociados a una limitación en la disponibilidad de oxígeno como la isquemia y la anoxia.

Los canales K_{ATP} localizados en la membrana plasmática de diferentes tipos de células juegan un papel importante en varios eventos celulares, incluyendo la salida de insulina de la células β pancreáticas y la relajación del músculo liso (11). Sin embargo, drogas como las sulfonilureas que inhiben la actividad de los ca-

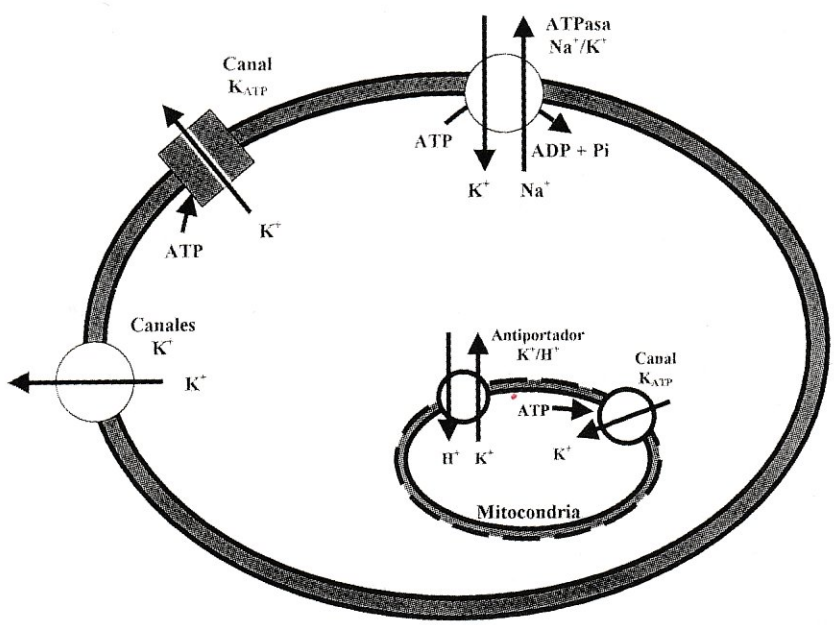


Figura 4. Sistemas de transporte de K^+ en la membrana celular y en la mitocondria.

nales K_{ATP} se emplean en el tratamiento de la diabetes mielitus tipo II, así como también se emplean activadores de canales K_{ATP} en el tratamiento de la hipertensión (11). Se ha detectado un tipo similar de canales altamente selectivos para K^+ y sensibles a ATP en la membrana interna mitocondrial. Los canales K_{ATP} pueden inhibirse no solo por adenín nucleótidos y sus análogos sino también por una variedad de sulfonilureas proporcionando evidencia de que los canales K_{ATP} mitocondriales poseen sensibilidad farmacológica semejante a los canales K_{ATP} de la membrana plasmática. (12).

La presencia de canales de K_{ATP} en la mitocondria se confirmó después del aislamiento de una fracción de membranas internas de mitocondrias de hígado de rata y de corazón de res; estas membranas se reconstituyen en bicapas lipídicas planares y se observó que el flujo electroforético de K^+ sensible a ATP fue activado por activadores de canales de K^+ como la cromakalina e inhibido por bloqueadores de canales de K^+ como el glibúrido.

Se cree que los canales de K^+ son el factor principal para mantener la homeostasis mitocondrial de K^+, que a su vez controla la presión osmótica y el volumen mitocondrial. Estos cambios de volumen son considerados como uno de los mecanismos importantes del control metabólico a nivel mitocondrial, ya que modulan procesos como la síntesis de citrulina, la carboxilación del piruvato y la oxidación de ácidos grasos.

Los canales K_{ATP} fueron originalmente descritos en sarcolema cardiaco y la apertura de estos canales K_{ATP} ha sido asociada con la disminución del potencial de acción cardiaco, el decremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} y la cardioprotección durante la isquemia (13). Sin embargo, todavía no han sido determinadas las consecuencias de la activación de los canales K_{ATP} en la mitocondria, incluyendo a procesos como la fosforilación oxidativa y el transporte de Ca^{2+}. Los compuestos que funcionan como activadores de canales K_{ATP} pueden ser utilizados como excelentes herramientas para estudiar la fisiología y participación de los canales K_{ATP} en la célula incluyendo la mitocondria (14).

Holmuhamedov y colaboradores (4), reportaron que en mitocondrias aisladas de músculo cardiaco, los activadores de canales de potasio indujeron la depolarización de la membrana, la aceleración de la respiración, el retardo en la producción de ATP, el incremento en la liberación de Ca^{2+} e inducción del hinchamiento mitocondrial asociado con la salida de proteínas del espacio intermembranal. Esos efectos son dependientes de la concentración de K^+ extramitocondrial y pueden ser inhibidos por bloqueadores de canales K_{ATP}.

Se ha observado que la apertura de canales K_{ATP} promueve la regulación de los niveles de Ca^{2+} en la mitocondria, esta regulación sobre los niveles de calcio se observó al estimular la apertura de canales K_{ATP} utilizando diferentes tipos de activadores de canales.

Estudios recientes sugieren que breves episodios repetidos de isquemia y reperfusión le proporcionan al miocardio mayor resistencia en contra de subsecuentes periodos de isquemia o reperfusión. Este fenómeno conocido como isquemia precondicionante es una habilidad que tiene el miocardio para protegerse del daño producido por la isquemia (15). Se han realizado diversos estudios para tratar de entender el mecanismo de la isquemia precondicionante sin encontrar hasta la fecha una explicación a ese fenómeno, aún así se ha observado que durante el precondicionamento se activan diversos receptores de membrana como son el receptor a adenosina y el receptor alfa adrenérgico. La activación de este tipo de receptores activan procesos de transducción que pueden activar proteinas cinasas C, estimular la forma inducible de la oxido nítrico sintasa o inducir la apertura de canales K_{ATP} (15). Se ha demostrado que en sistemas celulares que presentan receptores de adenocina tipo A-1, acoplados a proteínas Gi (inhibitorias), la adición de toxina pertussis interfiere con la activación de canales de K_{ATP}. Los canales K_{ATP} son muy abundantes en el tejido cardiaco y se les ha atribuido un papel cardioprotector durante los episodios de isquemia abreviando la duración del potencial de acción ventricular, reduciendo de esta manera la entrada de calcio y atenuando la contracción. Rohmann y colaboradores (16), utilizando como modelo de estudio al corazón de cerdo demostraron que el efecto cardioprotector de los canales de potasio sobre el IPC fue prevenido por glibenclamida, un bloqueador del canal K_{ATP}.

PERSPECTIVAS DE TRATAMIENTO

El papel farmacológico para el canal mitocondrial K_{ATP} en la isquemia parece aclararse. Normalmente, durante este proceso, los niveles de ATP en miocitos disminuyen y el corazón no sobrevive a la reperfusión debido a una liberación masiva de Ca^{2+} por parte de la

mitocondria. Cualquier pretratamiento con compuestos que abren los canales de K^+ o el precondicionamiento del tejido mediante un breve período de isquemia, protege al corazón durante la isquemia subsecuente. De esta manera aunque existe pérdida de ATP, el corazón recobra su función durante la reperfusión (4).

La cardioprotección por cualquier compuesto que estimule la apertura del canal K_{ATP} o el precondicionamiento es inhibido por los bloqueadores de este tipo de canales K_{ATP}. Otros grupos de investigación proponen que la conductancia al K^+ podría participar en la protección del músculo cardiaco por una posible regulación de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial (15).

En algunos estudios recientes sobre el fenómeno de isquemia precondicionante proporcionan evidencia de la participación de los canales K_{ATP} durante la cardioprotección. Estos canales se activan cuando los niveles intracelulares de ATP caen durante la isquemia. Entender que es lo que sucede durante el mecanismo de precondicionamieno podrá aumentar la habilidad para desarrollar nuevas aplicaciones farmacéuticas en contra del daño por isquemia y reperfusión.

El reconocimiento de los canales K_{ATP} mitocondriales como blanco de los activadores de canales de K^+ agrega una nueva dimensión a la farmacología de estos compuestos.

REFERENCIAS

1. Hochachka P W (1985) Defense Strategies Against Hypoxia and Hypothermia. Science *231*: 234 - 241.

2. Hansen A J (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. Physiol Rev 65: 101-148.

3. Ferrari R, Pedersini P, Bongrzio M, Gaia G, Bernocchi P, Di Lisa F, y Visioli O (1993) Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischemia and reperfusion. Basic Res Cardiol *88*: 495 - 512.

4. Holmuhamedov E L, Jovanovic S, Dzeja P P, Jovanovic A, y Terzic A (1998) Mitochondrial ATP-sensitive K^+ Channels modulate cardiac mitochondrial function. Am J Physiol (Heart Circ Phhysiol) *275*: H1567 - H1576.

5. Moore C L (1971) Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red. Biochem Biophys Res Commun *42*: 298-305.

6. Denton R M y McCormark J G (1985) Physiological role of Ca^{2+} transport by mitochondria. Nature *315*: 635.

7. Louiseau A, Leroy C, y Castaing M (1997) Potassium transport in opossum Kidney cells: Effects of Na-selective and K-selective ionizable cryptands, and of valinomycin, FCCP and nystatin. Biochim Biophys Acta *1330*: 39-49.

8. Brierley G P, Jurkowitz M S, Farooqui T, y Jung D W (1984) K^+/H^+ antiport in heart mitochondria. J Biol Chem *259*:14672-8.

9. Degrève L, Modesto Vechi S, y Quintale Junior C (1996) The hydratation structure of the Na^+ and K^+ ions and the selectivity of their ionic channels. Biochim Biophys Acta *1274*:149-156.

10. Smith J M y Wahler G M (1996) ATP-sensitive potassium channels are altered in ventricular myocyes from diabetic rats. Mol Cell Biochem *158*: 43-51.

11. Szewczyk A, Pikula S y Nalecz M J (1996) Effects of inhibitors and activators of ATP-regulated K^+ channel on miochondrial potassium uniport. Biochem Mol Biol Int *38*:477-484.

12. Ashcroft S J H, y Aschroft F M (1992) The sulfonylurea receptor. Biochim Biophys Acta *1175*: 45 -59.

13. Grover G J (1997) Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) openers in models of myocardial ischemia and reperfusion. Can J Physiol Pharmacol *75*:309 - 315.

14. Garlid K D, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler P A (1996) The mitochondrial K_{ATP} channel as a receptor for potassium channel openers. J Biol Chem *271* (15): 8796 - 8799.

15. Okubo S, Xi L, Bernardo N L, Yoshida K y Kukreja R C (1999) Myocardial preconditioning: Basic concepts and potential mechanisms. Mol Cell Biochem *196*:3 - 12.

16. Rohmann S, Weygandt H, Schelling P, Kie Soei L, Verdouw P D, y Lues I (1994) Involvement of ATP-sensitive potassium channels in preconditioning protection. Basic Res Cardiol *89*: 563 - 576.

BEB *19*(3): 164-173

FOSFATASAS DE PROTEÍNAS: MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN

Rocío Alcántara Hernández. Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Biología Celular, 04510 UNAM, México, D.F., Tel: 56-22-56-12, Fax: 56-22-56-11. Correo electrónico: ralcanta@ifisiol.unam.mx

RESUMEN

La regulación del estado de fosforilación de un gran número de proteínas es fundamental para un sinnúmero de procesos celulares. Proteínas que forman parte de las vías de transducción de señales intracelulares y de vías metabólicas son activadas o inhibidas por esta modificación postraduccional que ocurre básicamente en residuos de serina y/o treonina y tirosina. El estado de fosforilación se mantiene en equilibrio dinámico por dos clases de enzimas: las cinasas y las fosfatasas. En comparación con las cinasas, el estudio y la caracterización de las fosfatasas ha sido más difícil ya que no existen inhibidores específicos. Si bien algunos de estos inhibidores muestran selectividad *in vitro*, su selectividad *in vivo* es cuestionable. Sin embargo, en algunos casos, se ha logrado conocer la estructura y las propiedades funcionales de algunas de estas enzimas. La actividad catalítica de las fosfatasas es regulada por varios mecanismos moleculares: metilación, oxidación e incluso por fosforilación. Estas modificaciones sobre las fosfatasas propician un incremento o una disminución de la catálisis, que en algunos casos, lleva a la alteración del estado de fosforilación de diversas proteínas. Además, algunas fosfatasas son dependientes de cationes u otros cofactores proteicos como la calmodulina. Por el contrapeso que representa para las cinasas, el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan a estas enzimas es un punto clave para la comprensión del papel que juegan en el control de la proliferación, metabolismo, diferenciación o muerte celular, así como en enfermedades tales como el Parkinson, la Diabetes mellitus y algunos tipos de cáncer.

PALABRAS CLAVE: Fosforilación, fosfatasas de residuos de serina y/o treonina, fosfatasas de residuos de tirosina, regulación.

ABSTRACT

The regulation of numerous cell functions by phosphorylation is of great importance. Proteins that participate in signal transduction and metabolic pathways are activated o inhibited by phosphorylation, this postraductional modification occurs in a reversible form at serine and/or threonine and tyrosine residues. The phosphorylation state is manteined by two types of enzymes: protein kinases and protein phosphatases. The study of protein phosphatases has been more difficult due to the absence of specific inhibitors. Although these inhibitors show selectivity in vitro, their selectivity in vivo, is questionable. Despite all this, the structural and functional properties of some of these enzimes has been elucidated. The catalytic activity of protein phosphatases is regulated by diverse molecular mechanisms: metilation, oxidation, ions and phosphorylation. These modifications on protein phosphatases propitiate an increase or dicrease on their enzymatic activity. In abnormal cellular conditions, alteration in the phosphorylation state is observed. Current understanding about molecular mechanisms that regulate these enzymes represent a key point for the comprehension of their role in the control of proliferation, metabolism, differentiation or cellular death, and diseases such as Parkinson, Diabetes mellitus, cancer and immune dysfunctions.

KEY WORDS: Phosphorylation, serine/threonine-phosphatases, tyrosin-phosphatases, regulation.

INTRODUCCIÓN

En las vías de transducción de las señales extracelulares que regulan respuestas como la síntesis de proteínas, lípidos o carbohidratos, proliferación, diferenciación o muerte celular, participan numerosas proteínas que son moduladas por diversos mecanismos postraduccionales: fosforilación, metilación, oxidación y proteólisis. De estos, el mejor estudiado es la fosforilación, que se mantiene en equilibrio dinámico por la acción de dos clases de enzimas: las cinasas, aquellas que transfieren grupos fosfato a las proteínas a partir de moléculas energéticas como el ATP y, las fosfatasas aquellas que hidrolizan los enlaces monoéster liberando de las proteínas el fosfato unido (1). Comparativamente, las características es-

tructurales y funcionales de las cinasas se conocen con mucho más detalle. En eucariotos se han identificado al menos 2000 genes que codifican para cinasas y, únicamente 1000 genes que codifican para fosfatasas (2), número que quizás sea mayor ya que el estudio de estas últimas enzimas todavía se enfrenta al problema de no contar con inhibidores específicos. No obstante, se ha logrado: 1) la clonación e identificación de genes nuevos que codifican para fosfatasas, con ayuda de la tecnología del ADN recombinante y, 2) la deducción precisa de su estructura por el análisis de difracción de rayos X, en particular de las enzimas que desfosforilan residuos de tirosina (PTPs) como la PTP de *Yersinia,* PTPα, PTPμ, las PTPs con un dominio homólogo a Src como son SHP-1 y SHP-2, las PTPs humanas como PTP1B, HCPTPA y HCPTPB de bajo peso molecular, y más recientemente de la Cdc25A, una fosfatasa con actividad dual (esto es, que desfosforila residuos de serina/ treonina y tirosina) (3 a 6).

En sistemas celulares de organismos superiores se sugiere que dichas enzimas tienen un papel preponderante en diversos fenómenos, por ejemplo, en la degeneración de la retina (7), en el desarrollo del cerebro (7), en el metabolismo del glucógeno, principalmente en la gluconeogénesis (8) y en la progresión del ciclo celular (9), por mencionar algunos (Tabla I). Sin embargo, en otros fenómenos celulares, tales como la desensibilización de receptores, la activación o inhibición de cinasas y de las propias fosfatasas, la memoria, el aprendizaje o la muerte celular, en los cuales se ha demostrado que la fosforilación de proteínas es un mecanismo clave de regulación, la participación de las fosfatasas todavía no es completamente clara. Lo mismo sucede en fenómenos como respuesta a cambios en la osmolaridad, la esporulación, la asimilación de nitrógeno y carbono y la quimiotaxis, observados en bacterias, levaduras y plantas, y que son modulados por los sistemas de dos componentes (transmisor-receptor o sensor-regulador de la respuesta) en donde se ha demostrado que el estado de fosforilación de las proteínas es muy importante.

Los sitios blanco de acción, tanto de cinasas como de fosfatasas de proteínas en células de mamífero, se restringe a tres residuos: la serina, la treonina y la tirosina; mientras que en bacterias, levaduras y células vegetales son básicamente dos residuos modificados: la histidina y el aspartato (1, 2 y 10).

Esta revisión pretende, de forma resumida mencionar las características estructurales y funcionales de las fosfatasas, así como hacer referencia a los mecanismos moleculares que participan en la regulación de su actividad. La discusión se centra, particularmente en aquéllas fosfatasas que actúan sobre residuos de serina y/o treonina (PPs) y tirosina (PTPs).

I. CLASIFICACIÓN

A la fecha, se conocen aproximadamente 100 fosfatasas que actúan sobre residuos de serina y/o treonina. Estas fosfatasas se clasifican por criterios bioquímicos en los tipos 1, 2A, 2B y 2C agrupadas en dos familias. Desde un punto de vista filogenético las fosfatasas 1, 2A y 2B pertenecen a la familia PPP, y la fosfatasa 2C, entre otras, a la familia PPM llamada así por su dependencia al magnesio. Por su parte, las 60 fosfatasas de residuos de tirosina identificadas, se agrupan por su localización celular en dos clases: PTPs citoplásmicas o Tipo I y PTPs membranales o Tipo II, y dentro de estas dos clases se forman varios subgrupos con base en las características estructurales más comunes observadas entre ellas (2, 10 y 11).

II.ESTRUCTURA

a) PPs. Las PPs se distinguen porque están conformadas por una o más subunidades. Cuando están compuestas por más de una subunidad siempre hay sólo una subunidad catalítica y una o dos reguladoras (Fig 1A). PP1, PP2A y PP2B tienen un motivo catalítico común con dos dominios que constan de una hoja β flanqueada por α-hélices y un dominio predominantemente de forma helicoidal. Así por ejemplo, la PP1 está formada por una subunidad catalítica C de 37 kDa que tiene varias isoformas (Tabla I) y una subunidad reguladora G que le confiere a la proteína la capacidad de relocalización en la célula. Esta subunidad reguladora posee una región hidrofóbica en su extremo amino que le permite unirse directamente al glucógeno (2 y 8). La PP2A es más compleja, ya que puede formar el heterotrímero conformado por las subunidades A, B y C de 60, 55 y 36 kDa respectivamente, y alternativamente puede asociarse a otras subunidades de 35 y 70 kDa; además, en células transformadas, la PP2A puede formar el heterodímero AC y otros complejos con la proteína viral T intermedia (2). Por otro lado, la PP2B también llamada calcineurina, forma heterodímeros que constan de la subunidad catalítica A o calcineurina A (CnA) de 60 kDa que une calmodulina

y de la subunidad reguladora de 19 kDa que une calcio (CnB). La posibilidad de combinación de aproximadamente veinte subunidades reguladoras de las PPs da lugar a distintas fosfatasas, con mayor o menor especificidad por sus sustratos, además de conferirles una localización subcelular específica. Por ejemplo, se ha observado que la actividad y alta especificidad que tiene la PP2A por sus sustratos depende en gran medida de la concentración de dichas subunidades en la célula, y es particularmente la tercera subunidad, la B, la responsable de la unión a la membrana plasmática, y por tanto, de su relocalización subcelular (2 y 11).

La PP2C, a diferencia de las anteriores es la más simple de las fosfatasas de esta clase, se trata de un monómero de aproximadamente 45 kDa que no tiene homología con otras PPs, pero de la cual se han identificado las isoformas 1, 2, a y b (2 y 7) (Tabla I).

b) PTPs. La estructura de las PTPs transmembranales, con respecto a las PPs, se conoce con más detalle, tanto así que su clasificación depende de la estructura de la proteína. Existen cinco subgrupos de las PTPs: i) El subgrupo I se caracteriza porque sus miembros tienen un dominio extracelular muy largo; ii) El subgrupo II formado

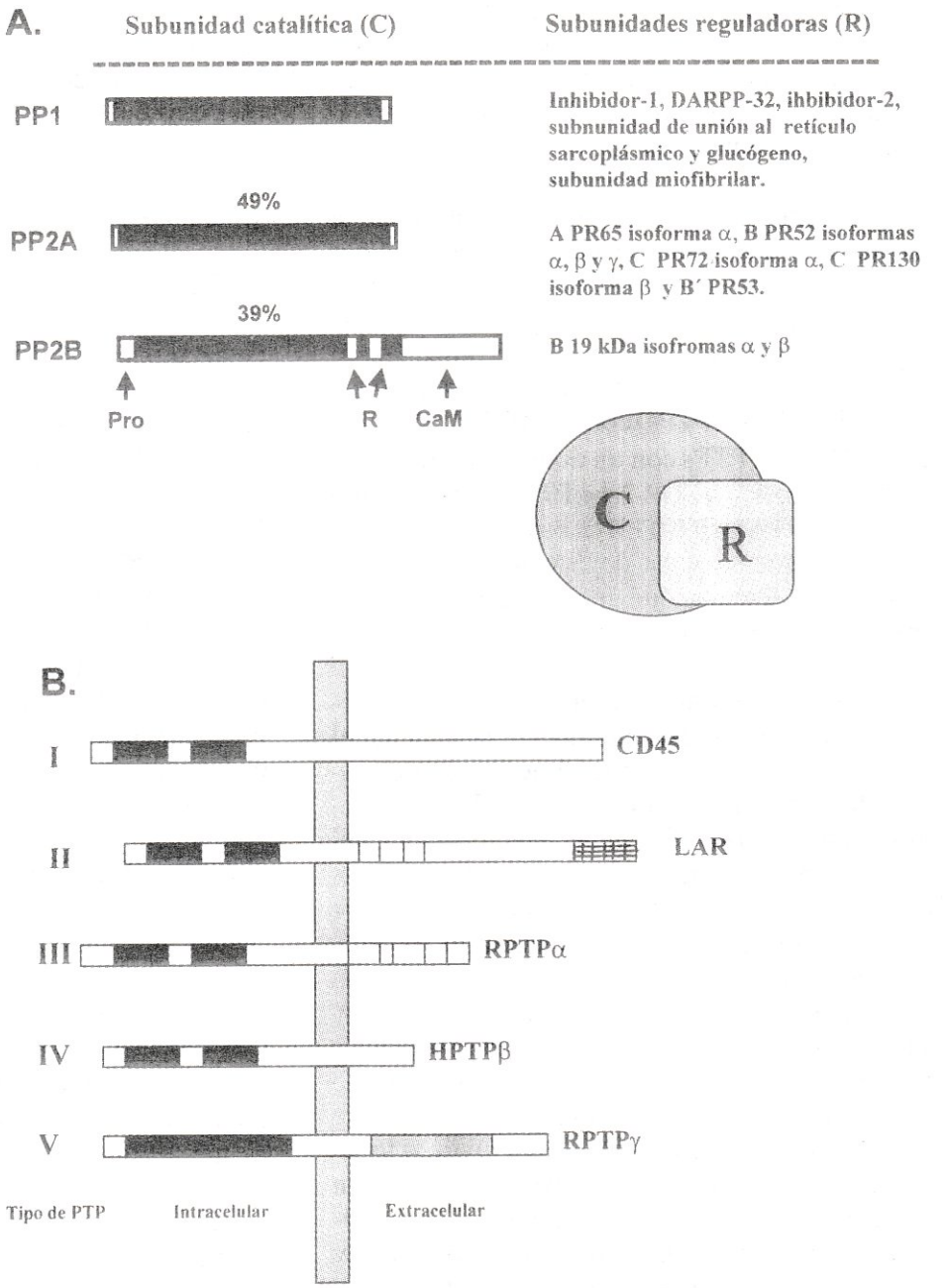


Figura 1. Estructura de PPs (subunidad catalítica-subunidad reguladora) y PTPs (una sola proteína con distintos dominios). A) PP1, PP2A y PP2B tienen un dominio catalítico muy similar (negro) se señala el porcentaje de homología (%), con respecto a la PP1. A la derecha se indican las subnunidades reguladoras con las que cada subunidad catalítica puede interactuar. La PP2B tiene, en el extremo amino un dominio con varias prolinas, muy importante para su actividad (Pro); y en el extremo carboxilo tiene el sitio de unión de la calmodulina, que además contiene una región que inhibe la actividad de la enzima en ausencia de calcio-calmodulina (CaM) y dos regiones pequeñas en el dominio catalítico que interactúan con subunidades reguladoras de 19 kDa (R). B) Las PTPs transmembranales se dividen en varios grupos, todas ellas tienen un dominio extracelular, de diferente tamaño entre sí y con diferente número de regiones semejantes a las inmunoglobulinas (cuadrícula) y a la fibronectina (gris), dependiendo del grupo al que pertenezcan, el grupo VI tiene una región parecida a la anhidrasa carbónica. El dominio transmembranal de las PTPs es corto y el dominio citoplásmico tiene uno o más dominios de fosfatasa (negro). (Figura tomada de las Referencias 2 y 10).

Tabla I

Características generales de la estructura, requerimientos iónicos, inhibidores, localización celular y función de fosfatasas de residuos de serina, treonina y tirosina.

Tipo de Fosfatasa	Sustrato	Inhibidores	Iones	Subunidad catalítica	Localización celular	Función
PP1	Subunidad β de la cinasa fosforilasa	Inhibidor-1 Inhibidor-2	Mn^{2+} Zn^{2+}	37 kDa Isoformas α, β, γ y δ	Núcleo Citosol	Control de la dinámica de microtúbulos Inactiva a la fosforilasa. Metabolismo del glucógeno Histonas?
PP2A	Subunidad α de la cinasa fosforilasa	Acido okadaico	No requiere	37 kDa Isoformas 0, 1, 2 y Sm	Núcleo Citosol Mitocondria	Regula la longitud de los microtúbulos Inactiva a la PKCα Efecto negativo en la transición G2 a M
PP2B	Subunidad α de la cinasa fosforilasa. Subunidad reguladora de la PKA II	Ciclosporina Ciclofilina Antagonistas de la CaM Calcineurina	Ca^{2+} Mg^{2+} Mn^{2+} Ni^{2+}	Monómero 60-61 kDa Isoformas α y β: (α1*,α2*,β1* y β2*; β3 en teratocarcinoma)	Citosol Núcleo Membrana plasmática Sinaptosomas	Activación de las células T Regula la activación de la ATPasa Na^+/K^+ y canales de K^+ Plasticidad Sináptica
PP2C	Caseína PK-CaM II Cadena ligera de la miosina	No hay inhibidores específicos	Mg^{2+} Mn^{2+}	Monómero 43-45 kDa Isoformas 1 y 2; a y b	Citosol	Regulación de la función neuronal Regulación de la gluconeogénesis
PTP1	Receptor de Insulina	Ortovanadato de sodio Tungestato	No requiere	35 kDa clases I a VI	Membrana plasmática	Activación de células T
PTP2	MAPK Hog-1	Ortovanadato de sodio	No requiere	Un dominio catalítico clases I a VIII	Citosol	Gastrulación Ovogénesis Control del ciclo celular Transformación Apoptosis

CAM: proteína calcio-calmodulina; * isoformas de la PP2B formadas por corte y empalme alternativo del ARNm (Tomado de las referencias 1, 2, 5 y 6).

por LAR (Leukocyte common antigen-related), DLAR (*Drosophila*-LAR), DPTP (*Drosophila* PTP), PTPμ, R-PTPI se distingue porque tienen de uno a tres dominios similares a las inmunoglobulinas en el extremo amino y adyacentes a secuencias repetidas de fibronectina; iii) Las proteínas del subgrupo III formado por PTPβ, DPTP99A, DPTP10D, DPTP4E y RPTPβ tienen una sola región de fibronectina; iv) Los miembros del subgrupo IV como RPTPα y HPTPε se identifican porque su dominio extracelular es muy pequeño; y finalmente v) Las PTPs tipo V como RPTPγ y RPTP tienen un dominio homólogo al sitio activo de las enzimas que unen zinc (2) (Fig 1B).

Algunas características estructurales de estas enzimas las hacen interesantes, por ejemplo, todos los miembros de la clase de PTPs membranales presentan un dominio que atraviesa la membrana plasmática y dos dominios de fosfatasa en el citoplasma, uno seguido del otro, con excepción de las fosfatasas DPTP10D, DPTP4E y HPTPβ que tienen uno solo (2). Existen PTPs con dominios SHP-1 y SHP-2, llamados así por su homología con los dominios 1 y 2 respectivamente, de la cinasa Src. Ambos dominios son muy importantes en la transmisión de señales extracelulares ya que por medio de ellos las fosfatasas pueden asociarse físicamente a proteínas que están fosforiladas en residuos de tirosina, como por ejemplo algunos receptores para factores de crecimiento (12 y 13). Se ha observado que la expresión de proteínas SHP-1 es particular de células hematopoiéticas y que regula negativamente la respuesta del receptor de eritropoietina, del receptor c-kit, del receptor Rel y del receptor del factor estimulador del crecimiento de colonias. Por otra parte, la expresión

de PTPs con el dominio SHP-2 es ubicua y se sabe que tiene un papel clave en el desarrollo, ya que la deleción del gen que lo codifica provoca severos defectos en la gastrulación de ratones, así como deformaciones de la cola e inhibición de la inducción del mesodermo en embriones de *Xenopus*. Además, la presencia de dominios SHP-2 en la estructura de las PTPs se ha conservado a través de la evolución ya que está presente en la estructura de PTPs de insectos (*Drosophila*), anfibios (*Xenopus*), nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) y de mamíferos, poniendo de manifesto que es un dominio relevante para la función de las fosfatasas (13).

Otras PTPs, entre ellas PTP humana (PTPH), se distinguen porque tienen en el extremo amino regiones homólogas al dominio característico de proteínas que forman parte de la superfamilia llamada banda 4.1. Estos dominios le confieren la capacidad de interacción con otras proteínas, además de dirigirlas hacia la interfase entre la membrana y el citoesqueleto (14).

La cristalización y el análisis por difracción de rayos X de PTP1B a 2.8 Å, PTP de *Yersinia* a 2.5 Å, de Cdc25A a 2.3 Å y de SHP-1 a 2.5 Å ha permitido conocer la estructura de estas enzimas a nivel molecular (2, 5 y 6). Estos estudios han revelado que la PTP1B, por ejemplo, consta de un solo dominio formado por ocho α-hélices y doce hojas β-plegadas, en donde el sitio catalítico se localiza dentro de un surco sobre la superficie de la proteína y que el sitio de unión del fosfato se encuentra en el residuo de cisteína 215, muy cerca de la doceava hojaβ (β-12) y de la cuarta α-hélice (α-4) en el amino terminal, ó en el residuo de histidina 214 localizada en la asa 15 entre la β-12 y α-4 en el extremo carboxilo de la hoja α paralela en *Yersinia*. Se especula, además, que un residuo de arginina que es invariable en todas las PTPs y que se encuentra en el motivo señal, es importante tanto para la unión del sustrato como para la estabilización del estado de transición durante la catálisis (2, 5 y 6).

III. MECANISMO DE REACCIÓN DE LAS FOSFATASAS

La reacción química que llevan a cabo las fosfatasas consiste en la hidrólisis de monoésteres de fosfato sobre aminoácidos específicos: serina y/o treonina y tirosina. El proceso es termodinámicamente favorable con un $\Delta G < -9$ kJ mol^{-1}, determinado a pH 7 y 25 °C. La hidrólisis entre el monoéster de fosfato en presencia de agua o de otros nucleófilos da como resultado la transferencia del grupo fosforilo (PO_3^-) lo que forma parte de un mecanismo limitante, efectuado en un solo paso en las PPs (Reacción I); y en dos pasos en el caso de las PTPs (Reacción II). Durante la catálisis de las PTPs el PO_3^- del sustrato es transferido al residuo de cisteína del sitio activo de la enzima formando un complejo intermediario tiofosfato-enzima unido covalentemente que, en un segundo paso es hidrolizado por agua formándose un complejo fosfoenzima, ahora unido de manera no covalente. La disociación del fósforo inorgánico de la enzima completa el ciclo catalítico (2 y 15).

Este mecanismo ha sido apoyado por reportes que demuestran que la oxidación de una cisteína del sitio catalítico de las PTPs, durante la reacción enzimática por oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) provoca su inhibición. Esta inhibición se debe, probablemente, a la formación de un residuo de cisteína portador de un ácido sulfénico (enzima-SOH) que previene, la formación posterior del intermediario (enzima-S-PO_3). Sin embargo, la inhibición es reversible ya que la presencia de tioles reductores (R-SH) en la célula, como el glutatión, reestablece su actividad (13).

También, con base en el análisis de la estructura de las fosfatasas LAR, VAR y PTP1B se ha determinado que el mecanismo de reacción descrito anteriormente es común para las PTPs, y que este involucra la formación de una fosfoenzima intermediaria. En contras-

Mecanismos de reacción propuestos

$$E + ROPO_3^{2-} + H_2O \longrightarrow ROH + HOPO_3^{2-} . E^* \qquad \textbf{(I)}$$

$$E + ROPO_3^{2-} \longrightarrow E . ROPO_3^{2-} \longrightarrow E^* . ROPO_3^{2-} \longrightarrow E^*\text{-}P \longrightarrow E^* . P \longrightarrow E + Pi \qquad \textbf{(II)}$$

Donde: E = enzima; E* = enzima activada; $ROPO_3^{2-}$ = sustrato fosforilado

te, en el mecanismo de reacción de las PPs no se forma el intermediario fosforilado durante la catálisis (15).

IV. FUNCIÓN DE LAS FOSFATASAS EN LA CÉLULA

Las fosfatasas, al formar parte de diversas vías de transducción de señales extracelulares, participan en el control de múltiples funciones. En general, las PPs median un espectro más amplio de procesos; las PTPs básicamente participan en procesos de proliferación y de transformación celular. A continuación se mencionan algunos ejemplos (Tabla I).

a) PPs. La PP1 participa en la regulación del metabolismo del glucógeno al asociarse directamente a este poliglucósido por medio de la subunidad reguladora. Esta enzima modula la fosforilación de la glucógeno fosforilasa, de la cinasa de la fosforilasa y de la glucógeno sintetasa (1, 2 y 16). Por su parte, la PP2A al desfosforilar a la L-glutamina:fructuosa-6-P-amidotransferasa regula la biosíntesis de hexosaminas, además de ser un regulador de la mitosis ya que otro de sus sustratos es la cinasa cdc25 que actúa sobre el factor promotor de la maduración (MPF) (2). En algunos casos, tanto la PP2A como la PP1 se han asociado con la transformación celular inducida por virus; sin embargo, en otros casos la PP2A participa como inhibidor de la proliferación (2). Por otro lado, la PP2B que se expresa principalmente en el sistema nervioso, en particular en los ganglios basales y en el hipocampo, regula la actividad de la PP1 al desfosforilar e inactivar a su inhibidor endógeno DARPP-32 ó I-1, por lo que se ha propuesto que este tipo de PP es indispensable en este tejido, a pesar de que se trata de una enzima ubicua en los mamíferos (2). Igualmente, a la PP2B se le ha asociado con procesos neurodegenerativos ya que su expresión es muy baja en las neuronas de animales que presentan los síntomas de padecimientos como la enfermedad de Huntington y el mal de Parkinson (2). Otros estudios en este mismo tejido indican que la PP2B regula canales de calcio dependientes de voltaje y receptores de la acetilcolina. En otro sistema celular, la PP2B participa en la vía de activación de linfocitos T ya que uno de sus sustratos es el factor nuclear de células T activadas (NF-AT). En su forma desfosforilada este factor se transloca al núcleo y, en conjunto con el NF-AT nuclear, activan a la ARN polimerasa e inducen la expresión de los genes de la interleucina-2 y de otras linfocinas y citocinas. Por tanto, la PP2B juega un papel central en la activación de linfocitos T (2).

El papel fisiológico de la PP2C se conoce poco en comparación con otras fosfatasas, quizás, porque no existen inhibidores específicos para esta enzima. Philip Cohen, un investigador reconocido por sus estudios en este campo, demostró *in vitro* que la PP2C es indispensable en el control del metabolismo del colesterol ya que regula la actividad de la hidroximetil-glutaril CoA reductasa, enzima limitante de la velocidad de la síntesis del esteroide (1). La PP2C también participa en la gluconeogénesis y en la contracción muscular; así como en la degeneración de la retina de los vertebrados (1, 2, 7 y 8).

b) PTPs. Dentro de esta clase, la PTPH1 ha sido ampliamente estudiada. Esta enzima participa en el control del ciclo celular, en la transformación, en la señalización mitogénica, en la apoptosis y en el aprendizaje. Muchos de sus efectos, al parecer, se deben a su gran capacidad de interactuar con toda una familia de proteínas ácidas de masa molecular de 30 kDa, y que le confieren distintas propiedades (2). CD45, una fosfatasa tipo receptor membranal, es fundamental en la respuesta inmune al regular positivamente las vías de señalización de receptores de células T y B (2), ver Tabla I.

V. MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN

A diferencia de las cinasas, las enzimas que desfosforilan proteínas son reguladas por diversos mecanismos. La mayoría de las PPs son moduladas por su asociación con diversas subunidades reguladoras; otras son blanco de modificaciones postraduccionales; y la gran mayoría de PPs de las clases 1 y 2, requieren para activarse de policationes como la protamina, las histonas, la polilisina y las poliaminas; otras moléculas como el AMP, el ADP, glucosa 1-P y fructuosa 1-P pueden inhibir su actividad, y algunos péptidos pequeños de 8 kDa derivados de la subunidad reguladora de la PP1 actúan como desinhibidores (2). Algunas PPs son moduladas por segundos mensajeros como la ceramida, un producto de la esfingomielinasa que activa a la forma trimérica de la PP2A *in vitro* (1 y 2).

Un caso especial de regulación *in vivo*, al menos visto para la PP2B, es su inhibición por la unión de complejos formados entre las inmunofilinas endógenas y drogas como la ciclosporina y la rapamicina. El grupo de L. K. Dixon observó que en células infectadas por virus, la inhibición de la calcineurina al formar estos complejos es la responsable de la protección de la

Tabla II
Resumen de fosfatasas reguladas por fosforilación, cinasas que participan y efecto de la fosforilación sobre su actividad.

FOSFATASAS	REGULADAS POR FOSFORILACIÓN	EFECTO	CINASA(S) QUE LAS FOSFORILAN
PP1	Sí, en Tyr Sí, en Ser/Thr	Inhibe Activa	$P60^{cSrc}$ PKA y Cinasa II de la caseína
PP2A	Sí, en Tyr Sí, en Thr *in vitro*	Inhibe	$P60^{cSrc}$, $p54^{Lck}$, R-EGF y R-I
PP2B	No determinado	----------	----------
PP2C	No determinado	----------	----------
PTP Transmembranal (ejem. CD45)	Sí, en Ser/Thr *in vitro* Sí, en Tyr *in vitro* e *in vivo*	No determinado Disminuye actividad	Cinasa II de la caseína PKC y Cinasa-3 de la glucógeno sintetasa
PTP Citosólica (ejem. PTP1C)	Sí, en Tyr	Inhibe	MAPK

R-EGF: receptor del factor de crecimiento epidérmico; R-I: receptor de insulina. La línea punteada (----) significa sin información (Tomado de las referencias 1, 2, 7, y 11).

célula huésped en contra de los virus (15). Lo que sucede es que la proteína viral llamada A238L forma un complejo con la calcineurina A previeniendo así la activación de NFAT y la consecuente transcripción de genes de citocinas inmunomoduladoras- dependientes del factor de transcripción, que se producen cuando existe una infección y se daña a la célula huésped (15).

Existen casos, en donde la actividad de las enzimas que desfosforilan residuos de serina y/o treonina depende de su localización en la célula, es decir, de su proximidad al sustrato. Un estudio realizado en el sistema nervioso muestra que la PP1 y la PP2A, en sus formas citosólicas, son más activas que aquéllas que se encuentran asociadas a la membrana plasmática. La baja actividad enzimática de estas fosfatasas se atribuye a la presencia cercana de otras proteínas que las regulan negativamente ya que actúan como inhibidores endógenos, es por ello que en determinados casos un sitio celular específico es sinónimo de una forma activa de la fosfatasa, y en otros de una forma inactiva (2 y 7).

Por otra parte, las PTPs son reguladas, básicamente, por la oxidación de un residuo de cisteína del dominio catalítico y cuya consecuencia es la inhibición de la actividad. Por lo que se ha sugerido, con base en estas observaciones, que el estado rédox de la célula también participa en la regulación de esta clase de fosfatasas.

A continuación se describen con más detalle los mecanismos, que por modificación postraduccional de las proteínas, regulan la actividad de las fosfatasas.

a) METILACIÓN. Esta forma de modificación postraduccional que se lleva a cabo por una carboximetiltransferasa sobre algunas PPs tiene un papel relevante en la regulación de la actividad de algunas de estas fosfatasas (2). La PP2A es metilada en el carboxilo terminal de la subunidad catalítica, específicamente en el carbono α del residuo de leucina 309 y su efecto es el de activar a la enzima, por lo que se ha sugerido que esta modificación postraduccional tiene una función reguladora. Curiosamente, la secuencia Thr-Pro-Asp-Tyr-Phe-Leu en el sitio de metilación de la PP2A se conserva desde las levaduras hasta el hombre, lo que apoya la idea de que la metilación tiene relevancia fisiológica. Más aún, se ha observado que la metilación de la PP2A depende de señales extracelulares (2).

b) FOSFORILACIÓN. La fosforilación es una modificación postraduccional que ocurre en numerosas pro-

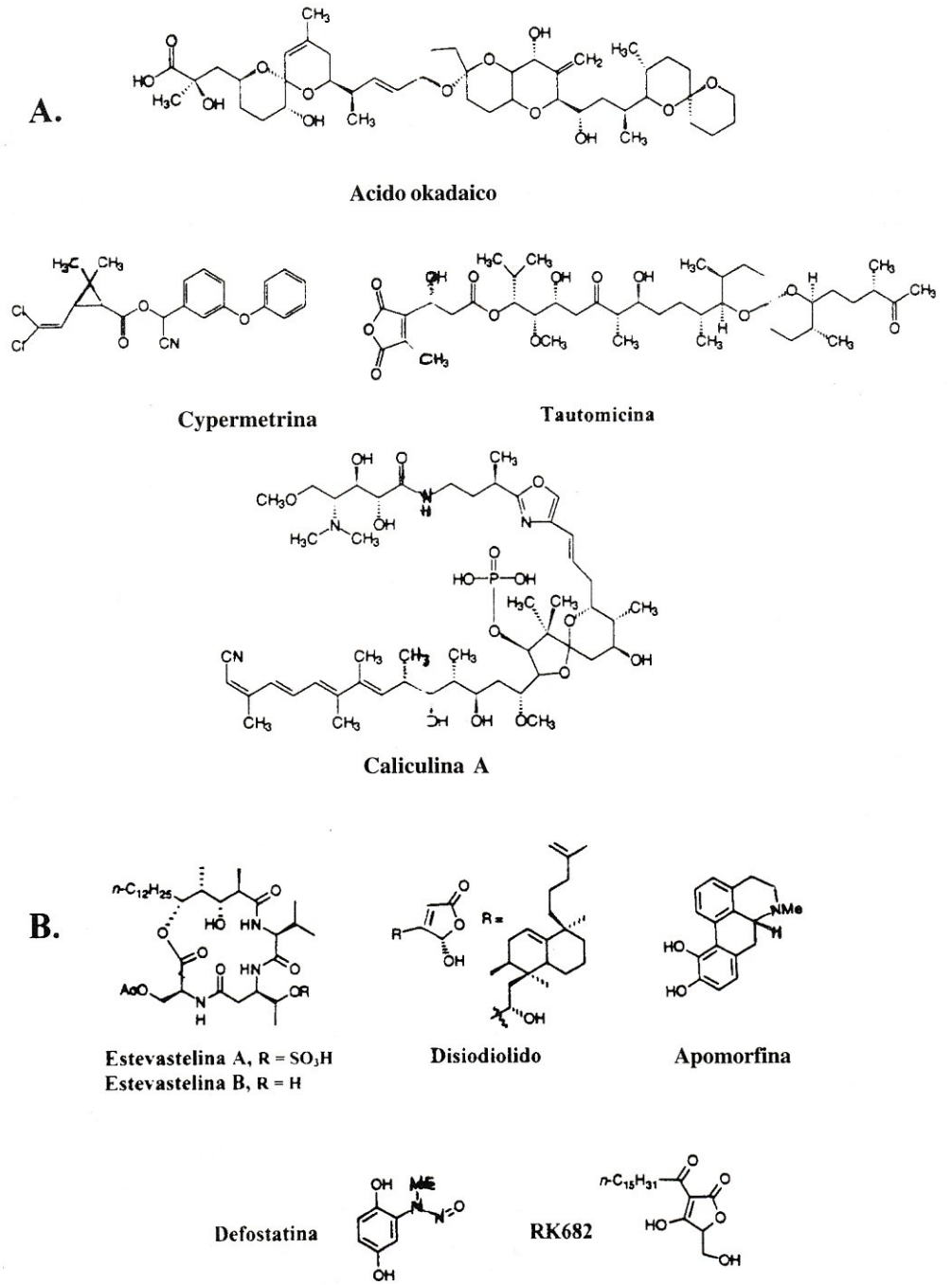


Figura 2. Estructura química de varios inhibidores de origen natural de las PPs y PTPs. Los inhibidores más empleados en el estudio de las PPs y de las PTPs son compuestos que se obtienen de organismos tales como dinoflagelados, bacterias y esponjas marinas. A) Inhibidores de PPs, ninguno de estos inhibidores tiene la potencia necesaria para inactivar a la PP2C. B) Inhibidores de PTPs. (Figura tomada de las Referencias 2 y 11).

teínas, incluyendo a las fosfatasas. A la fecha, existe un gran número de estudios que evidencian que esta forma de modificación de las PPs y PTPs es el principal mecanismo de regulación. Dependiendo de la fosfatasa particular, la fosforilación provoca la activación o la inhibición de la misma. Por ejemplo, la PP1 es fosforilada y activada por tres cinasas de residuos de serina y/o treonina: la PKA, la caseína II cinasa y la cdc2 que participa en la progresión del ciclo celular y además, en residuos de tirosina por la cinasa v-abl. Por su parte, la PP2A es fosforilada, exclusivamente en la tirosina 307 de la subunidad catalítica, por las cinasas $p60^{v\text{-}Src}$, $p56^{Lck}$, por el receptor del factor de crecimiento epidermal y por el receptor de insulina. La fosforilación de la PP2A provoca su desactivación de forma transitoria, lo que permite la amplificación de la señal; mientras que se reactiva por desfosforilación. La PP2A también es fosforilada en residuos de treonina por la PKCα, hecho que se relaciona con su reactivación (1, 2 y 10).

CD45 es fosforilada *in vitro* en residuos de serina y treonina e *in vivo* en residuos de tirosina por la cinasa II de la caseína, por la PKC y por la cinasa-3 de la glucógeno sintetasa (2); PTP1B es fosforilada en residuos de serina durante la mitosis, entre otras PTPs (2).

c) OXIDACIÓN. Como ya se mencionó anteriormente, las PTPs son reguladas por oxidación, modifi-

cación que es reversible gracias a la presencia de moléculas reductoras. Actualmente, se refuerza la idea de que la oxidación de las PTPs puede tratarse de una forma de control muy importante de la respuesta mitogénica ya que, en algunos sistemas celulares se ha observado que la inhibición de dichas enzimas va acompañada de la fosforilación de proteínas, de manera muy similar a la fosforilación que inducen diversos factores promotores de la proliferación (16).

VI. INHIBIDORES.

Una herramienta farmacológica indispensable en el estudio de las fosfatasas son los inhibidores, muchos de ellos son permeables a la membrana plasmática y pueden inhibir a las fosfatasas en la célula intacta. Se clasifican en inhibidores de origen natural e inhibidores sintéticos. Los primeros son metabolitos producidos por microorganismos tales como los dinoflagelados, bacterias, hongos, insectos y plantas; los segundos son moléculas diseñadas con base a la estructura de la proteína y a la naturaleza de las interacciones que éstas pueden formar con la fosfatasa (2 y 12).

a) Inhibidores de origen natural.

Dentro de esta clase, los compuestos con una alta potencia inhibidora para PP1, PP2A, PP2B y PP2C son: el ácido okadaico, un ácido graso poliéter producido por dinoflagelados y que se concentra en la esponja marina *Halichondra okadai* y cuya ingestión causa envenenamiento e incluso la muerte; la caliculina A que se extrae de esponjas marinas; la microcistina producida por cianobacterias; la tautomicina proveniente de la bacteria *Streptomyces spp* y la ciclosporina A de *Tolypocladium inflatum*, entre otros (2) (Fig 2A). Aunque pocos, se han identificado péptidos que actúan como inhibidores endógenos que bloquean la actividad de la PP1, se conocen como inhibidores-1 y -2 (2) (Tabla I).

Para las PTPs, se ha observado que los inhibidores generalmente son alcaloides tales como la aporfina, compuesto que se obtiene del tallo de *Rollinia ulei*, el cual bloquea la actividad de la CD45 con una dosis efectiva cincuenta alta (IC_{50}) igual a 5.3 μM. Otros compuestos como la estevastelina, representa a una familia de inmunosupresores que inhiben a las PTPs duales como la VAR; el disydiolido, aislado de la esponja marina *Disydea etheria* inhibe a la familia de cdc25, también con especificidad dual y el RK-608 derivado de *Streptomyces*, es un potente inhibidor competitivo de la VHR con una IC_{50} de 2.0 μM (2) (Fig 2B). Cabe mencionar que la IC_{50} de cada inhibidor está determinada en ensayos *in vitro* con la enzima purificada. Es muy común que a concentraciones relativamente altas del inhibidor se inhiba la actividad de otras fosfatasas, incluso de distintas clases, por ejemplo, 1nM de ácido okadaico inhibe a la PP2A, pero 1 mM inhibe también a la PP1 aunque no a la PP2B (Tabla I); compuestos relacionados con la apomorfina inhiben principalmente a las PTPs, pero también a la PP2A (2).

b) Inhibidores sintéticos.

La síntesis de inhibidores peptídicos y no-peptídicos de las fosfatasas es realizada por la industria farmacéutica. Muchas de las veces, estos inhibidores se sintetizan con base a la estructura de la proteína sustrato de la fosfatasa, y otras con base en el mecanismo de reacción del ciclo catalítico. Así, un buen inhibidor peptídico de las PTPs contiene fosfotirosina porque corresponde al sitio natural de fosforilación, sustituída en algunos casos por tiofosfato, un grupo no hidrolizable. Igualmente en el diseño de inhibidores, ha sido importante considerar a los aminoácidos que rodean a la fosfotirosina ya que son importantes para la catalálisis. Mediante la sustitución secuencial de cada aminoácido en un péptido específico se observó que la sustitución del ácido glutámico localizado hacia el extremo amino de la fosfotirosina por otro residuo como la alanina, reduce 130 veces la afinidad de la PTP de *Yersinia* por su sustrato. Se ha demostrado que se requieren un mínimo de seis aminoácidos para que la unión y la catálisis de la PTP sea eficiente.

Dada la susceptibilidad de los inhibidores peptídicos a la proteólisis, el desarrollo de inhibidores no-peptídicos para utilizarse como drogas en la práctica médica es muy importante. En este caso, el grupo químico más empleado es el difluorofosfonato porque mimetiza que la fosfotirosina se una con alta afinidad a la PTP.

VII. PERSPECTIVAS.

El conocimiento de las distintas fosfatasas, en cuanto a su estructura y función, se ha incrementado notablemente durante los últimos diez años, pese a las dificultades técnicas que se tienen para estudiarlas. Las proteínas fosfatasas participan como elementos moduladores clave en la amplificación de la señal extracelular, prácticamente en todas las vías de transducción de diversos organismos, manteniendo el equilibrio de la fosforilación de proteínas tales como cinasas, receptores, canales iónicos, factores de transcripción y proteínas efectoras. El esclarecimiento del papel que juegan las fosfatasas en fenó-

menos como la proliferación, la diferenciación o la muerte celular, entre otros, es tan importante como el esclarecimiento del papel de las cinasas. El diseño e identificación de inhibidores específicos de estas enzimas podría resultar fundamental para determinar la relevancia fisiológica que tiene la fosforilación de las proteínas en residuos de serina y/o treonina y tirosina, además de constituír potencialmente herramientas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades, que se han asociado con un incremento en la actividad de las fosfatasas, tales como el Parkinson, la Diabetes mellitus y el cáncer. Aunado a esto, la investigación de los mecanismos moleculares de regulación de fosfatasas particulares será muy valiosa. Por un lado, permitirá determinar los requerimientos de activación y/o inhibición, así como la identificación de sustratos, y por otro permitirá, profundizar en el conocimiento de la función que desempeñan individualmente en diferentes procesos celulares.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la lectura crítica y las sugerencias al manuscrito a los Dres. Adolfo García Sáinz, Marietta Tuena Sangri y Alejandro Zentella Dehesa.

REFERENCIAS

1. Cohen P (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. Trends Biochem Sci *17*:408-413.

2. Vincent JB y Crowder MW (1996) Phosphatases in cell metabolism and signal transduction: Structure, function and mechanism of action. Editorial RG Landes Company. Austin Texas USA,198 pp.

3. Guan J, Haun RS, Watson SJ, Geahlon AL, Dixon JE (1990) Cloning and expression of a protein tyrosine phosphatases. Proc Natl Acad Sci *87*:1501-1505.

4. Chernoff J, Schievella AR, Jost CA, Erickson RL y Neel BG (1990) Cloning of cDNA for a major human protein tyrosine phosphatase. Proc Natl Acad Sci *87*:2735-2739.

5. Barford D, Flint AJ y Tonks NK (1994) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase. Proc Natl Acad Sci *91*:1624-1627.

6. Stuckey JA, Schuber HL, Fauman EB, Zhang ZG, Dixon JE y Saper MA (1994) Crystal structure of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase at 25 Å and the complex with tungstate. Nature *370*:571-575.

7. Klummp S, Selke D, Fisher D, Baumann A, Muller F y Thanis S (1998) Protein Phospahatases type-2 isozymes present in vertebrate retinal: purification, characterization, and localization in photoreceptors. J Neurosc Res *51*:328-338.

8. Hubbard MJ y Cohen P (1989) The glycogen binding subunit of protein phosphatase 1G form rabbit skeletal muscle. Eur J of Biochem *180*:457-465.

9. Lee M S, Ogg S, Xu M, Parker LL, Donoghue DJ, Maller JL y Piwnica-Worms H (1992) cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. Mol Biol Cell *3*:73-84.

10. Wera S y Hemmings BH (1995) Serine/threonine protein phosphatases. Biochem J 311:17-29.

11. Shenolikar S (1994) Protein serine/threonine phosphatases-New avenues for cell regulation. Annu Rev Cell Biol *10*:55-86.

12. Shen SH, Bastien L, Posner BI y Chretien P (1991) A protein tyrosine phosphatase with sequence simillarity to the SH2 domain of the protein tyrosine kinases. Nature *352*:736-739.

13. Gutch MJ, Flint AJ, Keller, Tonks N K y Hengartner MO (1998) The *Caenorhabditis elegans* Sh2 domain-containing protein tyrosine phosphatase PTP-2 participates in signal transduction during oogenesis and vulval development. Genes and Dev *12*:571-585.

14. Zang S-H, Robayashi R, Graves PR, Worms HP y Tonks NK (1997) Serine phosphorylation-dependent association of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1 with 14-3-3b protein. J Biol Chem *272*:27281-27287.

15. Miskin JE, Abrams ChC, Goatley LC y Dixon LK (1998) A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. Science *281*: 562-565.

16. Sundarsen M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K y Finkel T (1995) Requierement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. Science *270*:296-299.

BEB 19(3): 174-181

NUEVAS ACCIONES DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Martha Zentella de Piña, Lenka Pimentel Velázquez, Héctor Vázquez Meza, Guadalupe Piña Zentella y Héctor Riveros Rosas. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNAM. Apdo. Postal 70159. Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F., Tel: 56-23-21-68, Fax: 56-16-24-19. Correo electrónico: martha@laguna.fmedic.unam.mx

RESUMEN

Los agentes anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), constituyen el grupo de fármacos más empleados en la terapéutica médica. Sin embargo, en los últimos años se han descrito numerosos efectos biológicos, adicionales a la clásica inhibición de la síntesis de prostaglandinas por la ciclooxigenasa (COX). Además, la reciente descripción de dos formas distintas de ciclooxigenasa que participan en funciones distintas, ha abierto a los farmacólogos la posibilidad de diseñar en forma más racional una "mejor aspirina". En éste trabajo se analizan algunas de las nuevas acciones de los AINES que son independientes de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y cuya trascendencia desde el punto de vista terapeútico no ha sido considerada.

PALABRAS CLAVE: Anti-inflamatorios no esteroideos, ciclooxigenasa, prostaglandinas, aspirina, transducción de señales, epinefrina.

ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) comprise one of most employed therapeutical agents. Interestingly, in the last years a wide spectrum of biological effects of NSAIDs, aditional to the classical inhibition of cyclooxigenase, have been described. Furthermore, the recent discovery of two isozymes of ciclooxigenase that carry on different functions has opened to pharmacologist the possibility of designing a 'better' aspirin with more rational criteria. In this work, some new actions of NSAIDs, independent of their inhibition of the synthesis of prostaglandins are reviewed.

KEY WORDS: Nonsteriodal anti-inflammatory drugs, cyclooxigenase, prostaglandins, aspirin, signal transduction, epinephrine.

INTRODUCCION

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) grupo de fármacos representado por la aspirina con más de 100 años de uso en la terapéutica médica (1), pertenecen al grupo de medicamentos con mayor número de prescripciones (2). Por esta razón durante el tratamiento médico, la posibilidad de administración simultánea con otros fármacos, hormonas, o bien agentes xenobióticos, es muy elevada; baste señalar como un ejemplo el etanol, que es el compuesto tóxico más consumido por los humanos. Los AINES, además de ser el grupo de medicamentos más consumidos en el mundo, son los causantes de la mayoría de los efectos colaterales debidos a su uso, de acuerdo con reportes elaborados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos. Tales efectos colaterales indeseables como daños gastrointestinales y renales con frecuencia son peligrosos (Tabla I); esto explica, parcialmente, el interés creciente en los estudios sobre este grupo de drogas. Los AINES tienen en común su habilidad para inhibir a la ciclooxigenasa prostaglandina H sintasa (COX) y con ello impedir, en mayor o menor grado, la síntesis de sustancias del tipo de las prostaglandinas, prostaciclinas y tromboxanos, sustancias que desencadenan numerosas respuestas tanto a nivel celular como en todo el organismos (3) (Fig 1).

En la farmacopea moderna se emplean gran número de medicamentos para reducir la concentración de prostaglandinas inhibiendo su síntesis. Varios de ellos fueron usados antes de que se conociera su mecanismo de acción. Quizá el ácido acetilsalisílico (aspirina) es el paradigma más conocido: esta droga inicialmente se empleó como analgésico aún sin conocer su mecanismo de acción. Finalmente, con el advenimiento del trabajo de Vane en 1971 (3), se reconoce a la aspirina como inhibidor de la ciclooxigenasa en el camino biosintético de las prostaglandinas, trabajo que lo llevó a obtener el premio Nobel. Este hallazgo fue suficiente para explicar durante muchos años gran parte de los efectos de la aspirina, los cuales además de la analgesia, incluyen la habilidad de reducir la fiebre y la inflamación, aumentar la secreción

TABLA I

EFECTOS COLATERALES DE LOS AINES

- Ulceración gastrointestinal e intolerancia
- Bloqueo de agregación plaquetaria (inhibición de síntesis de tromboxanos)
- Inhibición de la movilidad uterina (prolongación de la gestación)
- Inhibición de la función renal mediada por prostaglandinas
- Reacciones de hipersensibilidad

Tomado de la referencia 1

gástrica, inhibir la función renal (4), la plaquetaria y el flujo sanguíneo (5).

En la primera parte de este trabajo, se tratará la acción clásica y bien conocida de los AINES como inhibidores de la ciclooxigenasa, ya que los hallazgos recientes sobre las isoformas de la COX y las acciones de las mismas, obligan a replantear el clásico mecanismo de acción de los AINES, y sobre todo, las relacionadas con la posibilidad de encontrar una «mejor aspirina» exenta de efectos colaterales indeseables observados en los AINES actuales. Esto ha llevado a plantear la importancia de desarrollar una clasificación más racional de los AINES disponibles basada en su interacción con las dos isoformas de la COX conocidas (5).

En la segunda parte del trabajo se comentarán los efectos biológicos de los AINES que son independientes de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Aquí es importante notar que recientemente se han descrito las interacciones de los AINES con distintos sistemas hormonales; estas interacciones pueden ser responsables de algunos de los efectos de los AINES.

Inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas por los AINES.

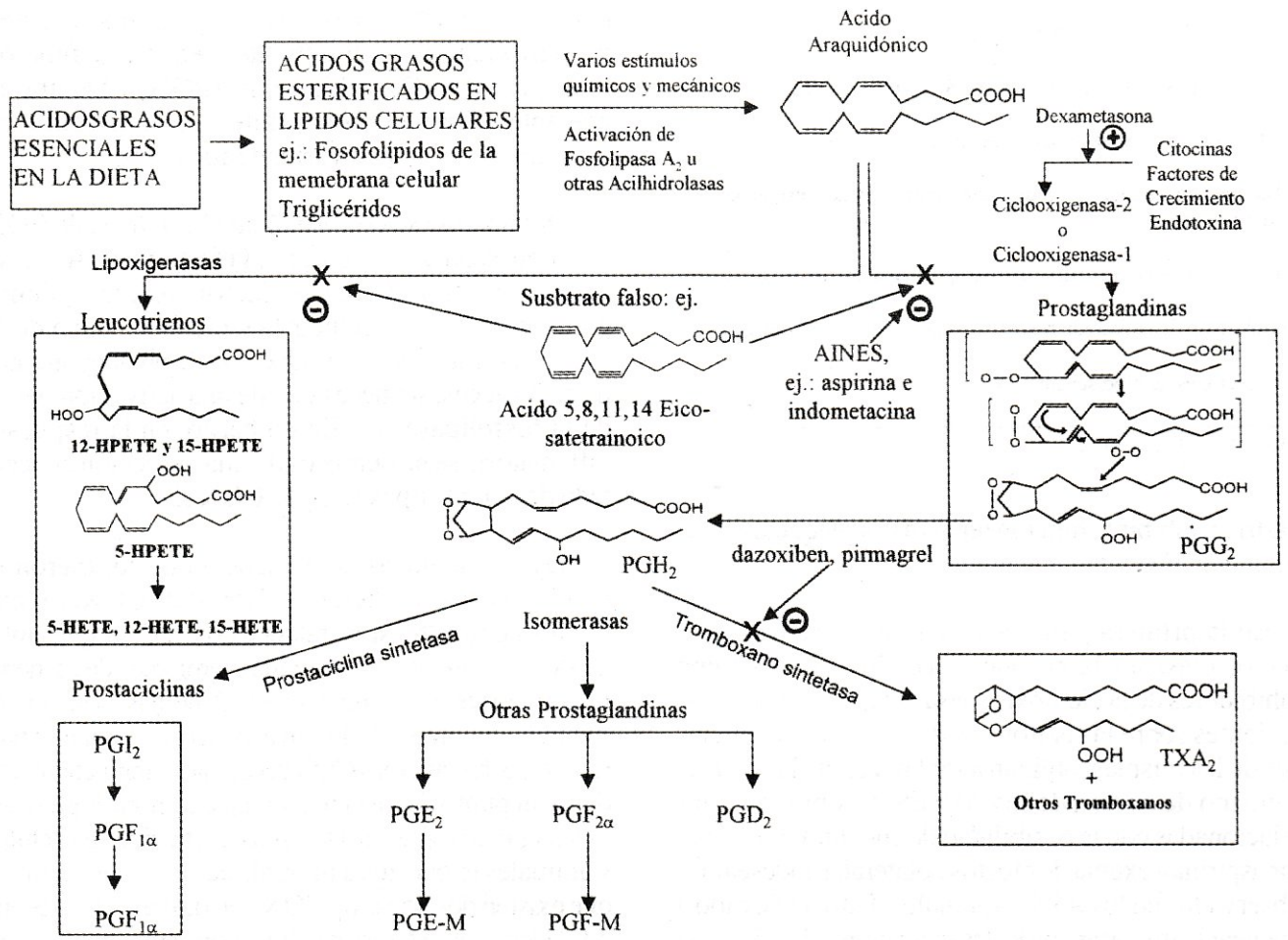
La síntesis de prostaglandinas requiere como paso inicial la liberación de ácido araquidónico, por acción de la fosfolipasa A_2 sobre los fosfolípidos de la membrana. Posteriormente, la enzima bifuncional prostaglandina endoperóxido sintasa o ácido graso ciclooxigenasa, cataliza la oxigenación del ácido araquidónico, para formar la prostaglandina PGG_2, que es un endoperóxido cíclico y en una reacción de peroxidación subsecuente, reduce la función hidroperóxido C_{15} a hidroxilo (PGH_2). De ahí en adelante diferentes prostanoides son sintetizados en forma específica por varios tejidos (Fig 1).

Inicialmente se consideró que la síntesis de COX era controlada únicamente por la fosfolipasa A_2, hasta que se descubrió que el factor de crecimiento plaquetario puede inducir la síntesis *de novo* de la COX y estimular así la producción de prostaglandinas hasta 28 veces, sin necesidad de una activación *per se* de la fosfolipasa A_2. Sin embargo, en la respuesta inflamatoria se ha demostrado una inducción concertada de la fosfolipasa A_2 y la COX (5).

Hay varias líneas de evidencia que sugirieron la existencia de dos diferentes formas de COX: los extractos de fibroblastos tratados con anticuerpos anti-COX, provenientes de vesículas seminales de carnero, fueron capaces de producir prostaglandinas en respuesta a la interleucina 1 (IL-1). En el ovario de la rata se han reportado dos enzimas COX reguladas diferencialmente desde el punto de vista hormonal e inmunológico. Al investigar la respuesta a los glucocorticoides en células y animales expuestos a lipopolisacáridos, se encontró que existen dos pozas de COX con diferentes susceptibilidades. Este estudio concluyó con el reconocimiento de que existe una forma de enzima inducible por polisacáridos y cuya síntesis es regulada por los glucocorticoides, lo que llevó a la clara discriminación de las isoformas de COX, una de las cuales es responsable de las funciones básicas dependientes de prostanoides y la otra de las reacciones inflamatorias. Posteriormente, los detalles bioquímicos de los RNAm respectivos y la localización de los genes fueron resueltos rápidamente (5).

La inhibición de los AINES sobre COX es específica; esto es, no inhiben a otras enzimas como la lipooxigenasa que comparte el mismo sustrato: el ácido araquidónico; en consecuencia, no se suprime la formación de leucotrienos.

La aspirina modifica de manera covalente ambas, la COX-1 y la COX-2, dando como resultado una inhibición irreversible de la actividad de ciclooxigenasa, este hecho distingue a la aspirina de otros AINES, porque la duración de los efectos de la aspirina depende de la velocidad con que se forma



Adaptada de la referencia 1

Figura 1. Biosíntesis de los productos derivados del ácido araquidónico. Se muestran las rutas principales del metabolismo del ácido araquidónico. La vía catalizada por lipoxigenasas da lugar a una gran variedad de leucotrienos y la vía de las ciclooxigenasas cataliza la formación de endoperóxidos (PGG y PGH) y productos subsecuentes. La ciclooxigenasa-1 (COX-1) se expresa constitutivamente. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es inducible por citoquinas, factores de crecimiento y endotoxinas, efectos que son bloqueados por glucocorticoides. Algunos compuestos: aspirina e indometacina inhiben la ciclooxigenasa pero no a las lipooxigenasas; mientras el ácido 5, 8, 14-eicosatetranoico inhibe ambas enzimas. El dazoxiben y el pirmagrel son inhibidores selectivos de la tromboxano sintetasa. (+) Activación; (-) inhibición.

la nueva COX en cada tejido. En la estructura de la COX-1, la aspirina acetila el residuo de serina 530 con lo cual se impide la unión del ácido araquidónico al sitio activo de la enzima y con ello se detiene la formación de prostaglandinas. En la COX-2, la aspirina acetila una serina homóloga que está en la posición 516. A diferencia de la COX-1, la COX-2 acetilada cataliza la formación del ácido 15- hidroxieicosatetraenoico (15-HETE), compuesto que en el metabolismo normal de los leucocitos se forma a partir del ácido araquidónico vía 15-HPETE y por la acción de una lipooxigenasa (Fig 1). La ciclooxigenasa plaquetaria es especialmente sensible a la inactivación por aspirina, porque para fines prácticos las plaquetas carecen de la capacidad de sintetizar proteínas y no pueden regenerar la COX. De esta manera, en un adulto, una sola dosis de 40 mg de aspirina puede inhibir la COX durante los 8 a 11 días de vida de las plaquetas humanas. El efecto inhibitorio tan fuerte de la aspirina sobre la COX plaquetaria sucede en la circulación portal antes de que la aspirina llegue al hígado y sufra la pérdida del acetilo y se convierta en ácido salicílico. A diferencia de la aspirina, el ácido salicílico carece de actividad acetilante. No obstante, este último, igual que la aspirina también disminuye *in vivo* la síntesis de prostaglandinas (3).

Las lipooxigenasas catalizan la otras vías importan-

TABLA II

CLASIFICACION QUIMICA DE ANALGESICOS, ANTIPIRETICOS Y AGENTES ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEREODEOS

- **Derivados del ácido salicílico:**
  Aspirina, salicilato de sodio, diflunisal, ácido salicílico, sulfasalazina y olsalazina.
- **Derivados del paracetamol:**
  Acetaminofen
- **Acidos aceticos de indene e indole:**
  Indometacina, sulindac y etodolac.
- **Acidos acéticos de heteroaril:**
  Tolmetina, diclofenac y ketorolac.
- **Acidos arilpropionicos:**
  Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno
- **Acidos antranílicos (fenamatos):**
  Acido mefenamico y ácido meclofenamico
- **Acidos enólicos:**
  Oxicam (piroxican, tenoxicam) pirazolidinediones (fenilbutazona y oxifentatrazona) y dipirona
- **Alcanonas**
  Nabumetona

Tomado de la referencia 1

tes del metabolismo del ácido araquidónico, la ruta de los leucotrienos: en un primer paso se agregan o colocan grupos hidroxiperoxil en diferentes posiciones de la molécula del ácido araquidónico (5, 12, etc.) para formar hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETE). Los tejidos difieren en su tipo de lipooxigenasa, por ejemplo, las plaquetas contienen solamente actividad 12-lipoxigénica y sintetizan solamente 12-HETE, mientras que los leucocitos poseen ambas actividades (5 y 12). Los HPETE son intermediarios inestables, metabolizables por varias enzimas a su correspondiente hidroxieicosatetraenoico (HETE), ya sea mediante peroxidasas o por la vía no enzimática. El 12-HPETE sufre un rearreglo molecular catalizado y forma un epóxido: la lipoxilina. De igual manera el 15-HPETE produce en los leucocitos un compuesto trihidroxilado: la lipocina. A partir del 5-HPETE las leucotrieno sintetasas continúan el metabolismo hacia los leucotrienos con diferentes actividades biológicas.

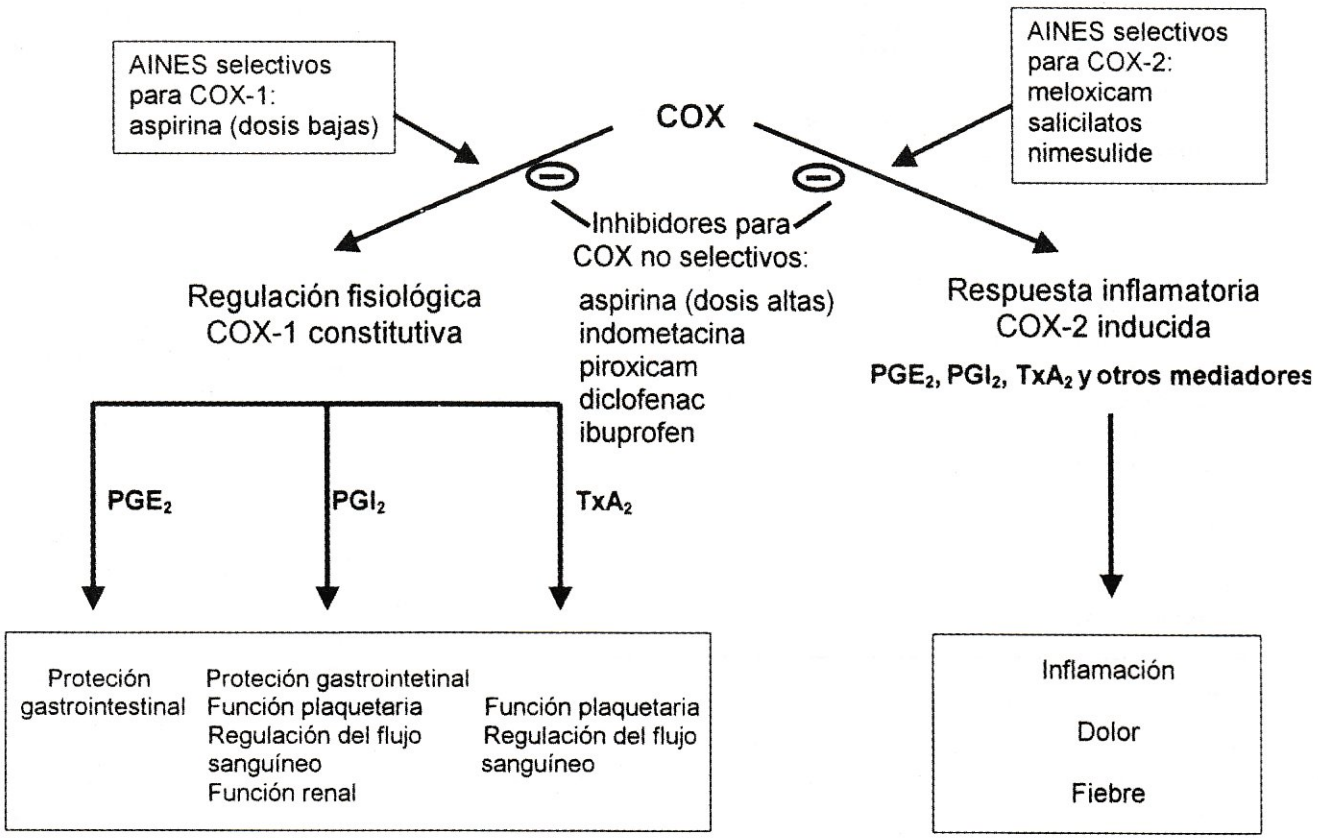
En la Tabla II se muestra una clasificación química de los AINES. La gran mayoría de los AINES presentados en dicha tabla, en contraste con la aspirina, son inhibidores reversibles que actúan compitiendo por el sitio activo de la COX. Los AINES constituidos en su mayoría por ácidos orgánicos son bien absorbidos por vía oral, se unen fuertemente a las proteínas plasmáticas y son excretados por filtración glomerular o tubular. En contraste con la aspirina, cuya duración de su efecto esta determinada por la velocidad se síntesis de nueva ciclooxigenasa, la duración de la acción de todos los demás AINES depende de sus propiedades farmacocinéticas. Generalmente se dividen en los de vida media corta (menos de 6 h) y los de vida media larga (más de 6 horas). Además, como los AINES son ácidos orgánicos, pueden acumularse en los sitios de inflamación, hecho muy atractivo desde el punto de vista médico.

A partir del reconocimiento de la existencia de las isoformas de la COX han aparecido muchos estudios, que versan tanto sobre la COX-1 que es la forma constitutiva, como sobre la COX-2, que es la forma inducida.

La COX-1 se encuentra en casi todas las células, en las plaquetas resulta esencial para la síntesis de tromboxano A_2, que es necesario para la agregación plaquetaria. La activación de la COX-1 determina la producción de prostaciclina que es antitrombogénica cuando se secreta en el endotelio y es citoprotectora cuando es producida por la mucosa gástrica. La citoprotección es extensiva tanto a sustancias exógenas que dañan la mucosa gástrica como a la producción endógena de jugo gástrico. La inhibición de la producción de las prostaglandinas gástricas es considerada como la causa de los efectos colaterales más frecuentes y peligrosos debidos al consumo de AINES.

En el riñón las prostaglandinas se sintetizan en la médula, corteza renal y en el asa de Henle, e influyen en la distribución del flujo sanguíneo renal, reabsorción de agua y sodio, y en la secreción de renina.

La COX-2 se encuentra en pequeñas cantidades en pulmones, riñón y membranas fetales, pero su actividad resulta principalmente de su inducción. La COX-1 también cambia su expresión pero su actividad solamente puede aumentar 2 a 3 veces, mientras que la COX-2 aumenta 20 veces durante la reacción inflamatoria. Las endotoxinas inducen poderosamente a la COX-2 en monocitos humanos y en macrófagos



Adaptada de la referencia 5

Figura 2. Los inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa (COX) inhiben ambas ciclooxigenasas: COX-1 y COX-2; simultáneamente inhiben fiebre, dolor e inflamación junto con la función fisiológica de los prostanoides. Los inhibidores selectivos inhiben preferentemente COX-2 y dejan intacta las funciones de agregación plaquetaria, formación gástrica y renal de prostanoides. **PGE_2**: prostaglandina E_2; **PGI_2**: prostaglandina I_2; **TXA_2**: tromboxano A_2.

de ratón *in vivo* también en macrófagos murinos, en rata, conejo, y en alveolos humanos. La estrecha relación entre la respuesta inflamatoria y la inducción de COX-2 es cada vez más evidente; con base a estudios en los cuales se emplean citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias se ha podido caracterizar la regulación de la inducción de la COX-2 en forma bastante acertada; por ejemplo, el interferon γ (INF-γ y el factor de necrosis tumoral (TNF) inducen a la COX-2 en macrófagos, mientras que la citocina antiinflamatoria IL-10 inhibe su expresión.

Recientemente se ha propuesto una clasificación para los AINES de acuerdo con la relación de sus efectos inhibitorios sobre las actividades COX-1/ COX-2. Así, por un lado, existen inhibidores selectivos para la actividad COX-1, y por otro lado, se tienen inhibidores no selectivos, o bien altamente selectivos, de la actividad COX-2. Con esta clasificación puede hacerse una predicción de gran utilidad sobre los efectos farmacológicos principales y los efectos colaterales de los AINES (4) (Fig 2).

Efectos biológicos de los AINES independientes de la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas.

Los AINES son fármacos con una gran diversidad de efectos biológicos muchos de los cuales están determinados por mecanismos independientes a la inhibición de las ciclooxigenasas (6), entre estos pueden citarse las modificaciones sobre los procesos dependientes de membranas. Tal propiedad de

los AINES potencialmente explicaría por ejemplo sus diversos efectos sobre los componentes de los sistemas de transducción de señales. Así, es posible observar que cambios en la viscosidad de la membrana desacoplan la señalización de receptores dependientes de la fluidez de la membrana; los AINES interfieren con el cambio de GTP/GDP en la subunidad α reguladora de la proteína G, efecto dependiente del ensamble de la proteína G heterotrimérica en la bicapa de fosfolípidos de membrana. También en membranas aisladas de neutrófilos los AINES bloquean la ADP ribosilación de la proteína G, dependiente de toxina pertusis, e inhiben parcialmente la formación de diacilglicerol dependiente de toxina pertusis, resultante de la activación celular (7).

Además, los AINES pueden modificar la actividad de las cinasas celulares (8), e inhiben la actividad del factor de transcripción nuclear kB (NF-kB), proteína pivote en el control de la expresión de genes dependientes de citocinas (9). La inactivación de dicho factor por la aspirina también ha sido descrita como mecanismo protector contra la neurodegeneración, según datos publicados por Guilli y cols. en 1996 (10).

Más aún, los AINES pueden inhibir la captación de calcio en los neutrófilos; aumentar los niveles intracelulares de AMPc (11); inhibir la actividad de la fosfodiesterasa (8); inhibir la actividad de la fosfolipasa C (12); disminuir los aumentos de triacilglicéridos (TAG) y substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) inducidos por una dosis elevada de etanol (13); actuar como secuestradores de radicales libres (14, 15) e inhibir la producción de superóxido en neurófilos estimulados (16).

Varias de las acciones enlistadas son el resultado de la propiedad de los AINES de antagonizar algunas de las respuestas inducidas por las hormonas, de manera que no sorprende que, por ejemplo, antagonicen la agregación plaquetaria inducida por la epinefrina (17) e inhiban la producción de glicerol resultante de la lipólisis estimulada con epinefrina en adipocitos aislados de rata (18). Si bien para el ácido salicílico ya habían sido reportadas algunas observaciones sobre la protección del hígado graso inducido por una dosis elevada de etanol (19), no existían datos sobre el control de especies reactivas del oxígeno (ROS), medidas como se dijo, por la reacción con el ácido tiobarbitúrico, ni tampoco se habían hecho estudios empleando otros AINES. Es probable que los AINES aminoren el daño hepático mediante el bloqueo de la descarga adrenérgica que ocurre cuando se administra etanol a la dosis de 5g/kg peso corporal, evitando de esta manera la lipólisis en tejido adiposo periférico, la movilización excesiva de ácidos grasos hacia el hígado, su re-esterificación a TAGs y la instalación del hígado graso. Experimentos en relación al posible mecanismo están siendo realizados por nuestro grupo y eventualmente nos permitirán ofrecer una explicación sobre como los AINES evitan el hígado graso y el aumento de especies reactivas del oxígeno inducidas por una dosis elevada de etanol (18, 20).

Otros estudios indican que los AINES son capaces de atenuar parcialmente el efecto hipotensor de los agentes bloqueadores de adrenorreceptores α y β (21). Los AINES también son capaces de modificar el metabolismo energético. Así en hepatocitos aislados los AINES, por mecanismos independientes a la inhibición de la COX (22), estimulan la glucogenólisis, la glucólisis, el consumo de oxígeno e inhiben la gluconeogénesis. La prostaglandina E tiene varios efectos sobre la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina. Los mismos efectos pueden ser inducidos por estimulación α adrenérgica que, se sabe bien, estimula la síntesis de PGE. Una substancia candidato para explicar estos hechos es la PGE, porque los niveles altos de la misma mimetizan muchos de los efectos de la estimulación α adrenérgica. Es bien sabido que la administración aguda de glucosa, desencadena la secreción de insulina en sujetos normales, este hecho es conocido como respuesta aguda de la insulina a la glucosa (AIR). La epinefrina es capaz de inhibir la AIR después de un pulso de glucosa (20 g) por vía intravenosa. Metz y cols. en 1980 encontraron que los AINES tienen la propiedad de restaurar parcialmente la AIR descendida por la epinefrina y por otros agonistas α adrenérgicos (23). El antagonismo entre los AINES y los agentes adrenérgicos es evidente en varias observaciones: los AINES atenúan la respuesta antisecretora a la xilazina, un agonista de los receptores α2 adrenérgicos en preparaciones de epitelio de yeyuno de rata (24); reducen los cambios de presión intraocular inducidos por la epinefrina en el conejo (25); revierten los efectos del bloqueo crónico del receptor β para atenuar la transmisión neurovascular adrenérgica en perros (26). Así también, los agonistas adrenérgicos pueden antagonizar

respuestas inducidas por AINES, por ejemplo, la analgesia inducida con dipirona y flunixin pueden ser revertidas por atipamezol -agonista α2 adrenérgico- (27). Adicionalmente, en un sistema completamente diferente, los AINES antagonizaron el efecto antihipertensivo de los antagonistas de receptores β adrenérgicos. Por último, es importante comentar sobre los experimentos en roedores y otros estudios epidemiológicos que demuestran el papel protector de la aspirina, indometacina, piroxicam y sulindac sobre el desarrollo de tumores del colon inducidos por agentes carcinógenos. Se desconoce el mecanismo de acción, pero puede involucrar la supresión de la proliferación celular o la estimulación de la respuesta inmune debido al efecto inhibitorio sobre la síntesis de prostaglandinas. También se han reportado efectos similares en humanos en relación a la regresión de pólipos en pacientes con poliposis familiar tratados con sulindac (29). Los datos sobre los efectos inmunorregulatorios de las prostaglandinas y las acciones inmunomoduladoras de los AINES revelan que la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, por si sola, no puede explicar todas las propiedades anti-inflamatorias de estos agentes. Para el caso de la respuesta inmune y la respuesta inmune humoral, es probable que la actividad de los AINES pueda estar relacionada con la función celular supresora, o la inhibición de la migración y la activación de los neutrófilos (30).

La amplia variedad de efectos antagónicos producidos por los AINES en las respuestas inducidas por las hormonas hace pensar en forma tentativa que este antagonismo pueda comprender otras respuestas que aún no han sido analizadas.

En conclusión, la acción clásica de los AINES sobre la ciclooxigenasa se ha visto enriquecida con el hallazgo de 2 isoformas de la COX, la COX-1 y la COX-2, la primera constitutiva que al ser inhibida por los AINES disminuye la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos y afecta la función gastrointestinal, plaquetaria renal y la regulación del flujo sanguíneo. La COX-2 es inducible y se expresa en los sitios donde ocurre la inflamación, los inhibidores de su síntesis o de su actividad abaten la síntesis de prostaglandinas estrictamente relacionadas con la inflamación, del dolor y la fiebre.

Se consideran aparte otras acciones de los AINES, posiblemente no mediadas por la inhibición de ninguna COX, que incluyen cuatro tipos de acciones: metabólicas en general, antagónicas hacia los agonistas adrenérgicos, promotoras de la desaparición de la poza de radicales libres tisulares y modificadoras de las respuestas membranales de transducción de señales. La importancia de las nuevas acciones de los AINES, que son las más relacionadas con el trabajo de investigación de los autores, aún no ha acabado de jerarquizarse.

REFERENCIAS

1. Insel PA (1996) Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents; drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout. En: Gilman AG, Roll TW, Nies AS y Taylor P (eds). Goodman and Gilman: The pharmacological basis of therapeutics. Editores. Pergamon Press, New York, pp 617-657.

2. Langman MJS (1988) Ulcer complications and nensteroidal anti-inflammatory drusg. Amer J Med *84*: 15-19.

3. Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature *231*: 232-235.

4. Clive DM y Stoff JS (1984) Renal syndromes associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. N Engl J Med *310*: 563-571.

5. Frölich JC (1997) A classification of NSAIDS according to the relative inhibition of yclooxigenase isoenzymes. Trends Pharmacol Sci *18*: 30-34.

6. Cashman JN (1996) The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. Drugs *52* (Suppl 5): 13-23.

7. Abramson SB, Leszczynska-Piziak J, Clancy RM, Philips M y Weissmann G (1994) Inhibition of neutrophil function by aspirin-like drugs (NSAIDS): requirement for assembly of heterotrimeric G proteins in bilayer phospholipid. Biochem Pharmacol *47*: 563-572.

8. Earnest DL, Hixson LJ y Alberts DS (1992) Piroxicam and other cyclooxygenase inhibitors: potential for cancer chemoprevention. J Cell Biochem (suppl) *161*: 156-166.

9. Kopp E y Ghosh S (1994) Inhibition of NF-Kappa B by sodium salicylate and aspirin. Science *265*: 956-959.

10. Grilli M, Pizzi M, Memo M y Spano P (1996) Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF Kappa B activation. Science *274*: 1383-1385.

11. Weissmann G, Korchak H, Ludewig R, Edelson H, Haines K, Levin RI, Herman R, Rider L, Kim- mel S y Abramson S, (1987) Non-steroidal anti-inflammatory drugs: How do they work?. Eur J Rheumatol Inflamm *8*: 6-17.

12. Bomalaski JS, Hirata F y Clark MA (1986) Aspirin inhibits phospholipase C. Biochem Biophys Res Commun *139*: 115-121.

13. Zentella de Piña M, Hernández-Tobias A, Saldaña-Balmori Y, Díaz-Belmont A y Piña E (1992) Biochemical ethanol effcts affected by a non-steroidal anti-inflammatory drugs. FEBS Lett *298*: 132-125.

14. Auroma OI y Halliwell B (1988) The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. Xenobiotica *18*: 459-470.

15. Castrejón M, Zentella de Piña M, Piña E, Boldú JL, Muñoz E y Gleason R (1997) Effects of piroxicam on two *in vitro* free radical production systems (phenylhydrazine autooxidation and Fenton reaction). Res Commun Pharmacol Toxicol *2*: 261-267.

16. Abramson S, Korchak H, Ludewig R, Edelson H, Haines K, Levin RI, Herman R, Rider L, Kimmel S y Weissmann G (1985) Modes of action of aspirin-like drugs. Proc Natl Acad Sci *82*: 7227-7231.

17. Koyychev R, Alken RG y Gromnica-Ihle E (1994) Serum concentration of peroxicam and inhibition of platelet aggregation in patients with rheumatoid arthritis and M. Bechterew. Agents Actions *43*:48-52.

18. Pimentel-Velázquez L, Ramírez-González MD, Zentella de Piña y Piña E (1996) Piroxicam inhibits epinephrine-induced stimulation of glycerol production inisolated rat adipocytes. Proc West Pharmacol Soc *39*: 31-32.

19. Stone DB, Browm JD y Steele AA (1969) Effect of sodium salicylate on anduced lipolysis in isolated fat cell of the rat. Metabolism *18*: 620-623.

20. Piña Zentella G (1999) Inhibición de la lipolisis por naproxen en adipocitos aislados de ratas. Tesis Recepcional. Facultad de Ciencias. Biología. UNAM.

21. de Leeuw P (1996) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hypertension. Drugs *51*: 179-187.

22. Salgueiro-Paradigorria CL, Constantin J, Bracht A, Nascimento EA y Ishii-Iwamoto EL (1996) Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug piroxicam on energy metabolism in the perfused rat liver. Comp Biochem Physiol *113c*: 93-98.

23. Metz SA y Robertson RP (1980) Prostaglandin synthesis inhibitors reverse α-adrenergic inhibition of acute insulin response to glucose. Am J Physiol *239*: E490- E500.

24. Cox HM y Cuthbert AW (1989) Antisecretory activity of the alpha 2-adrenoreceptor agonist, xylazine in rat jejunal epithelium. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol *339:* 669-674.

25. Anderson L y Wilson WS (1990) Inhibition by indomethacin of the increased facility of outflow induced by adrenaline. Exp Eye Res *50: 119-126.*

26. Daniell HB, Webb JG, Walle T, Oatis JE y Gaffney TE (1988) Inhibitors of prostaglandin synthesis reverse the effects of chronic beta-receptor blockade to attenuate adrenergic neurovascular transmission in dogs. J Cardiovasc Pharmacol *12*: 300-307.

27. Chambers JP, Waterman AE y Livingstone A (1995) The effects of opioid and α2 adrenergic blockade on non-steroidal anti-inflammatory drug analgesia in sheep. J Vet Pharmacol Ther *18*: 161-166.

28. Johnson, AG, Nguyen TV y Day RO (1994) Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. Ann Inter Med *121*: 289.

29. Michael JT, Mohan MN y Clark WH (1991) Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. N Engl J Med *325*: 1593-1596.

30 Goodwing JS (1984) Inmunological effects of NSAID. Symposium on NSAID. Amer J Med 7-15.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

TEMA: Cinética enzimática
INACTIVACIÓN TÉRMICA.

Las mitocondrias del protista *Euglena gracilis* oxidan L- y D-lactato por medio de deshidrogenasas membranales que están conectadas a la cadena respiratoria, y son independientes de piridín nucleótidos (iLDH). Con el propósito de distinguir entre (1) la presencia de dos proteínas diferentes que catalizan la misma reacción pero con isómeros diferentes y (2), una sola enzima con afinidad para los dos isómeros, se determinó la termoestabilidad de la deshidrogenación con L- y D-lactato. Las mitocondrias de *E. gracilis* se incubaron a diferentes temperaturas por los tiempos indicados. La actividad de iLDH se determinó espectrofotometricamente, después de la adición de uno de los isómeros del lactato midiendo la reducción del aceptor artificial de electrones diclorofenolindofenol (DCPIP), siguiendo el cambio en la absorbancia a 600 nm. A continuación se presentan las velocidades iniciales a concentraciones saturantes de lactato.

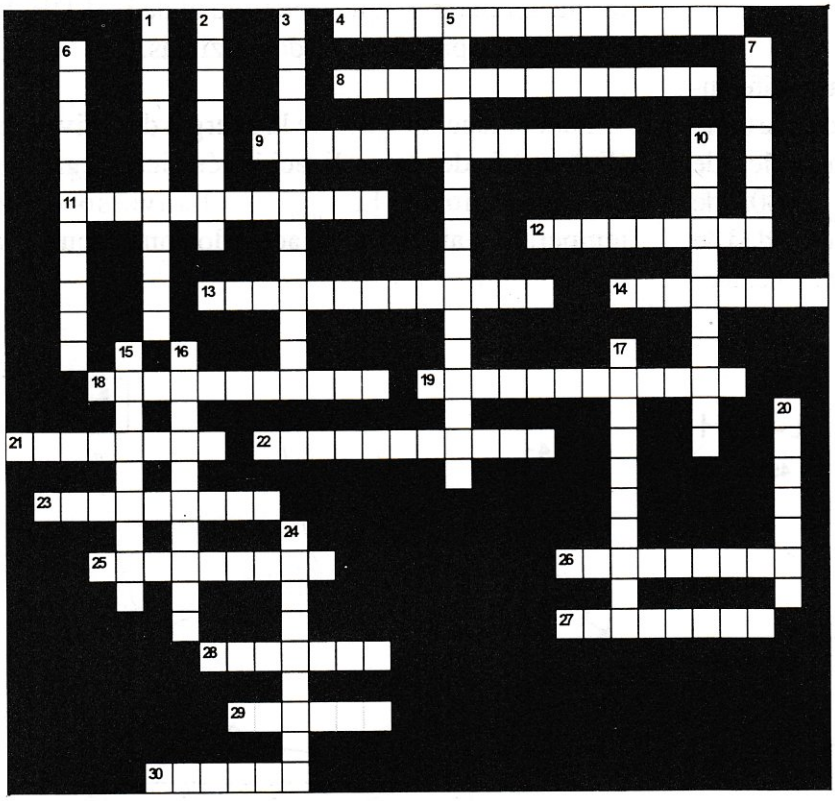
Actividad de L-iLDH 8nmol DCPIP/min/mg prot)											
t (min)	Act 45°C	t (min)	Act 50°C	t (min)	Act 55°C	t (min)	Act 60°C	t (min)	Act 65°C	t (min)	Act 70°C
2	186	1	145	1	193	0.5	175	0.25	177	0.2	232
3	162	2	135	2	61	1	165	0.5	165	0.5	179
4	152	3	84	3	56	1.5	107	0.75	136	0.6	63
5	150	4	99	4	22	2	19	1	78	0.8	15.5
		5	87	5	16	2.5	10	1.25	22		
						3	5				

Actividad de D-iLDH (nmol DCPIP/min/mg prot)													
t	Act	t	Act	Act	Act	t	Act	t	Act	t	Act	t	Act
(min)	55°C	(min)	60°C	65°C	70°C	(min)	75°C	(min)	80°C	(min)	85°C	(min)	90°C
3	390	2	357	401	275	1.5	244	1	141	0.5	287	0.16	353
6	378	4	345	353	188	3	42	2	37	1	12	0.33	367
9	376.9	6	329	319	150	4.5	22	3	35	1.5	8	0.5	349
12	376	8	340	299	149	6	31	4	10	2	6	0.66	190
15	370	10	327	289	126	7.5	20	5	5	2.5	4	0.83	19

Determinar para los dos isómeros: las constantes de velocidad de inactivación térmica para cada temperatura, determinar en cuantos eventos se lleva a cabo el proceso de inactivación térmica y calcular la energía de activación de desnaturalización.

CRUCIBIOQ
QUÍMICA DE LÍPIDOS

Yolanda Saldaña Balmori



HORIZONTALES

4. De 20 carbonos con un anillo de 5 carbonos, entre otras funciones estimulan la inflamación.
8. Acido graso que es indispensable en los fosfolípidos de la membrana.
9. Vitamina D3, de estructura cíclica similar a la del colesterol, su deficiencia produce raquitismo.
11. El ácido araquidónico es el precursor de la síntesis de estas moléculas.
12. Acido graso saturado de 18 átomos de carbono.
13. Las de muy baja densidad transportan a los triacilglicéridos sintetizados endógenamente.
14. La combinación de esfingosina con un ácido graso.
18. Presente en la esfingomielina.
19. Acido graso esencial, al igual que los ácidos linoleico y linolénico.
21. Al esterilizarse con tres ácidos grasos, constituye el almacén de energía más abundante en los mamíferos.
22. Acido que se asocia con CDP-colina para formar un tipo particular de fosfolípidos.
23. Vitamina liposoluble que protege a la membrana de los radicales libres.
25. Sustancias derivadas del ácido fosfatídico, son la reserva más importante de colina.
26. Grupo funcional presente en los ácidos grasos.
27. El cólico y desoxicólico forman parte de este grupo de ácidos.
28. Grupo heterogéneo de sustancias que son solubles en solventes no polares.
29. Acidos que son líquidos a temperatura ambiente cuando tienen dos o más dobles ligaduras.
30. Acido graso de 18 carbonos, una doble ligadura y no es esencial.

VERTICALES

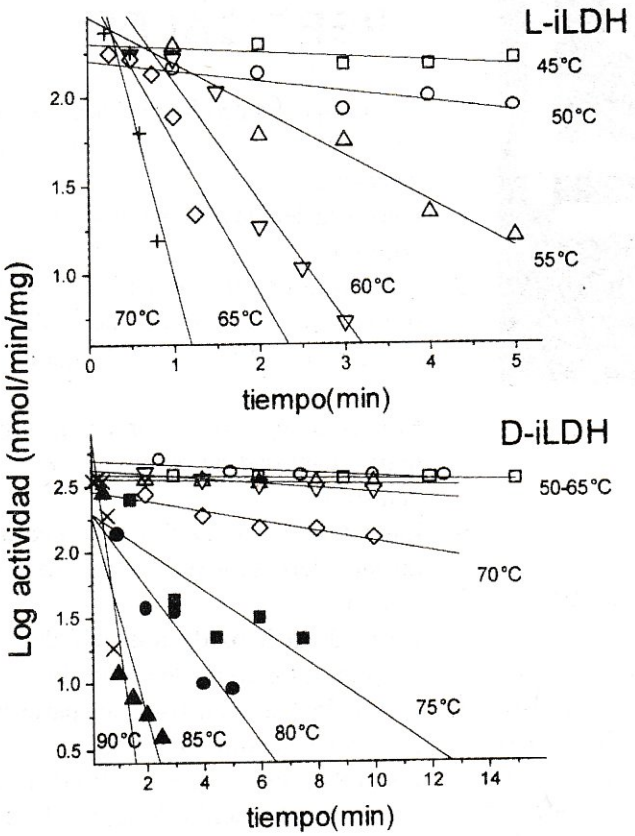
1. Formado por esfingosina, un ácido graso y un azúcar que puede ser glucosa o galactosa.
2. Patología debida al aumento de lípidos corporales.
3. Lipoproteínas de gran tamaño que transportan a los lípidos de la dieta desde el intestino hasta el hígado y tejido adiposo.
5. Molécula cuya oxidación produce la mayor cantidad de energía en el organismo.
6. Las vitaminas A, D, E y K son compuestos derivados de este tipo de estructura.
7. Derivado de la oxidación tanto de los carbohidratos como de los lípidos.
10. Son moléculas en las que una parte es hidrófoba y la otra es hidrófila.
15. Dentro de este grupo de lípidos se encuentran los ácidos biliares, el cortisol y las hormonas sexuales.
16. Acido graso insaturado de 18 átomos de carbono y tres dobles ligaduras.
17. Precursor de hormonas cortiosuprarrenales y sexuales.
20. Vitamina que puede producir un complejo con la opsina, denominado rodopsina.
24. De 16 carbonos, presente en todas las grasas animales y vegetales.

BEB *19*(3): 184-185

PROBLEMA BIOQUÍMICO

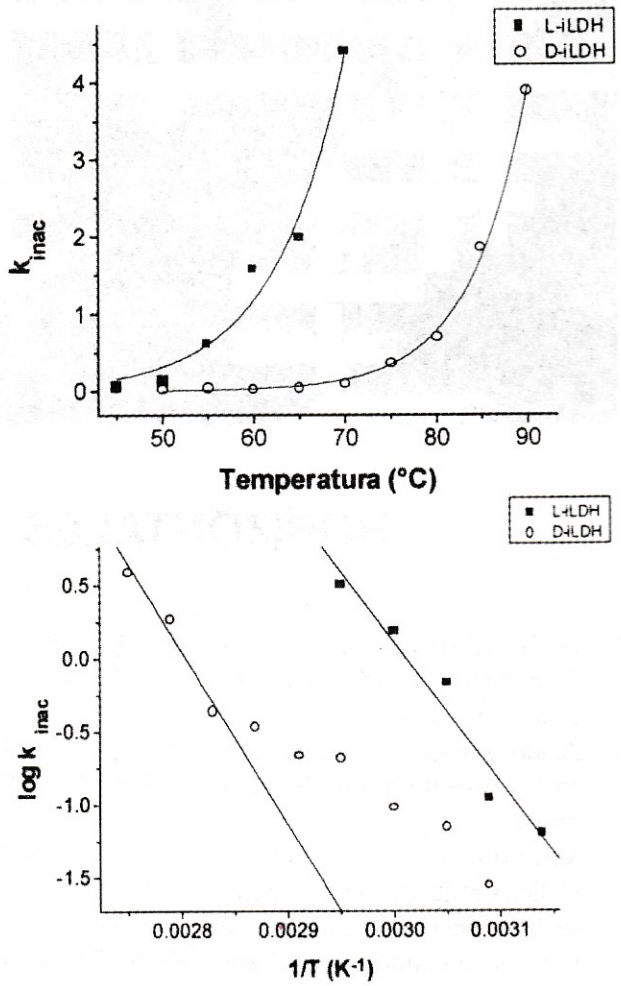
RESPUESTAS:

El logaritmo de las velocidades obtenidas a las diferentes temperaturas se grafican *vs* el tiempo al cual se tomó la muestra como se muestra en la primera gráfica, de acuerdo con la ecuación: log v=log v_0- (k_{inac} t/2.303) de esta forma, se obtiene una constante de velocidad de primer orden (k_{inac}) a partir del valor de la pendiente.



Para determinar el número de eventos en que se lleva a cabo la inactivación térmica de la L- y D-iLDH, se grafican los valores obtenidos de k_{inac} *vs* la temperatura a las que fueron calculadas. En la parte superior de la segunda figura se observa claramente que la inactivación de ambas iLDH es un solo proceso, se dice entonces que es un proceso monotónico. Además con este gráfico se observa que la actividad de D-iLDH es mucho más resistente a la temperatura que la actividad de L-iLDH, lo que indicala presencia de dos enzimas.

Para obtener el valor de la energía de activación (Ea) para la desnaturalización térmica, se grafica el logaritmo de la k_{inac} *vs* el inverso de la temperatura absoluta, de acuerdo con la ecuación de Arrhenius:



log k_{inac} = - (Ea/2.303R) (1/T) + log k_0 donde Ea es el valor de la pendiente multiplicado por la constante de los gases R (1.9872 cal/mol K) y por 2.303. Nótese que para la D-iLDH, sólo se consideraron los valores de k_{inac} de las tempe-

raturas mas altas, ya que como se observa en gráfica superior de la segunda figura, la inactivación se observa hasta los 80°C.

Los valores de Ea fueron de 44 y 55 Kcal/mol para la L-iLDH y D-iLDH respectivamente. Estos datos apoyan la presencia de enzimas específicas para cada isómero y descarta la posibilidad de una sola enzima con especificidad para los dos isómeros

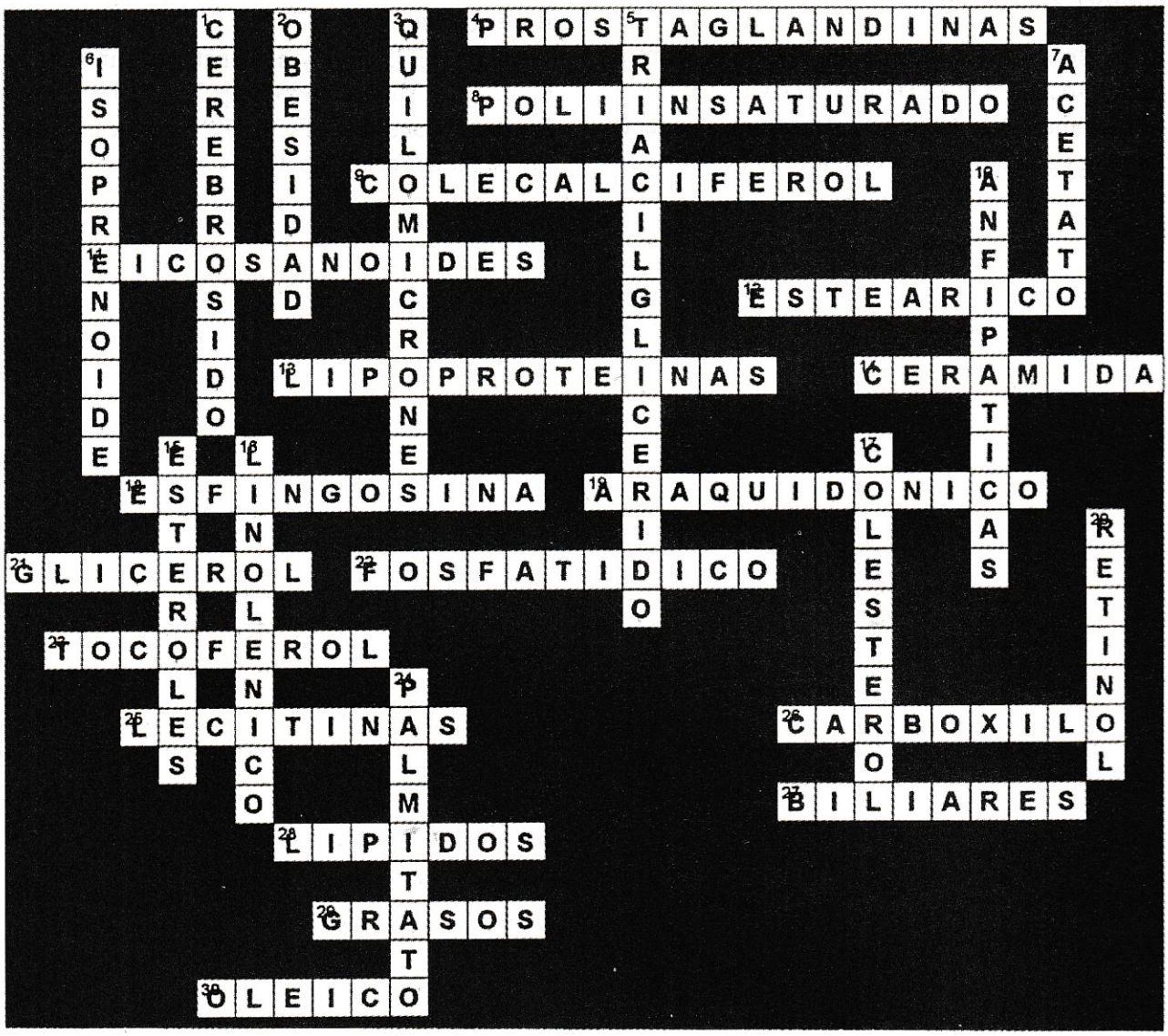
Bibliografía

Segel IH (1975). Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York. Cap 11B pp 927-935

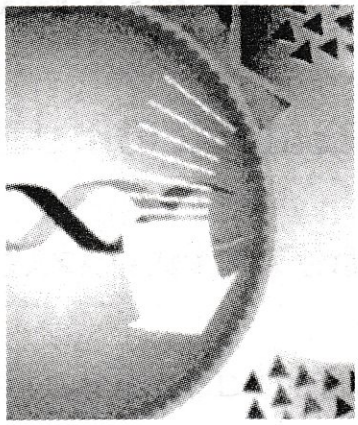
Dixon MW and Webb EC (1979) Enzymes. Academic Press, New York. Cap 3, pp 164-182

BEB *19*(3): 186

SOLUCION AL CRUCIBIOQ



IV SIMPOSIO
ESTRÉS OXIDATIVO EN BIOMEDICINA



Julio 16-18, 2001, Ciudad de La Habana, Cuba

INVITACIÓN

El Comité Organizador del IV Simposio Internacional de Estrés Oxidativo en Biomedicina, tiene el placer de invitarle a participar en nuestro evento que tendrá lugar en el Centro de Investigaciones Biomédicas "Victoria Girón" del 16 al 18 de julio del 2001.

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) por medio de señales redox intervienen en diferentes procesos biológicos mediante la estimulación de mecanismos de transducción.

Estas especies activan segundos mensajeros intracelulares y están íntimamente relacionadas con la biosíntesis de citoquinas que se convierten en señales de comunicación intercelulares determinantes para el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

En estos días de intercambio científico se impartirán conferencias y se realizarán presentaciones orales y de carteles.

Los principales tópicos que se desarrollarán son:

* Mediadores de la comunicación intercelular y la respuesta oxidativa.
* Apoptosis.
* Respuesa inflamatoria sistémica.
* Mecanismos regulatorios de la rspuesta oxidativa.
* Estrés oxidativo y enfermedad.
* Endotelio, oxidación de LDL y ateroesclerosis.
* Antioxidantes como moduladores de la respuesta oxidativa.
* Piel: ¿Blanco o generador de estrés oxidativo?
* Estrés oxidativo y envejecimiento.

Inscripción

* Médicos especialistas y otros profesionales	50.00
* Médicos residentes y reserva científica	30.00

No. de cuenta: 012421110391048

CUPÓN DE INSCRIPCIÓN

Nombre y apellidos_____
Institución_____
Dirección_____
Teléfono_____
Fax_____
Email_____
Tipo de participación:_____
Conferencia _____Cartel _____
Mesa redonda_____
Presentación oral_____
Sólo participar_____
Alojamiento_____

El Comité Organizador estará muy gustoso de contar con su participación.

Enviar resumen y artículo antes del 31 de enero del 2001. Fecha límite de inscripción sin recargo.

Envíe tres copias del resumen en papel y una del artículo completo en soporte informático de 3.5 pulgadas utilizando Microsoft Word (Times New Roman 10).

La extensión máxima será de ocho cuartillas para los trabajos originales, 12 las revisiones y cuatro las comunicaciones breves e informes de casos, incluidas las tablas y figuras.

La primera página contendrá el nombre de la institución que auspicia el trabajo, el título que no excederá las 15 palabras, nombres y apellidos completos de todos los autores ordenados según su participación, grado científico y categoría docente o investigativa más importante de cada autor.

La segunda página incluirá un resumen informativo de 150 palabras, como máximo, contentivo de los propósitos, procedimientos empleados, resultados más relevantes y principales conclusiones del trabajo al igual que cualquier aspecto novedoso.

Las referencias bibliográficas deben cumplir con las normas de Vancouver.

Los resultados y discusión deben presentarse separados. Las tablas, modelos y anexos no se intercalarán en el artículo.

Fecha límite de inscripción 31 de mayo del 2001 con recargo del 20 por ciento.

Coauspiciadores:
CIREN
CIS LA PRADERA
CQF, IFAL, CENATOX, CIO, CNIC.

Para mayor información contactar a:
Dra. Niurda Llópiz Janer. Sec. Comisión Científica
ICBP "Victoria de Girón". 146 No. 3102, Cubanacán,
Playa 11600, Ciudad La Habana, CUBA
Fax: 537337853
Email: niurka@giron.sld.cu

BEB *19*(3): 188

SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2000

Realización del

XXVII Taller de Actualización Bioquímica

Del 14 al 17 de agosto de 2000

y del

VIII Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C

El 18 de agosto de 2000.

Sede
Palacio de la Escuela de Medicina
Facultad de Medicina de la UNAM
esquina de Venezuela y Brasil,
Centro Histórico de la Ciudad de México, DF.

Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Medicina
de la UNAM

Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica,
A C

XXVII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

Semana del 14 al 17 de agosto de 2000

HORA	LUNES 14	MARTES 15	MIÉRCOLES 16	JUEVES 17	VIERNES 18
8:00	Inscripción				
9:00 a 9:15	Inauguración	Nutrición. Emma Gloria Ramos CINVESTAV	Óxido nítrico. Diether Masher Fac. Medicina, UNAM	Toxicología molecular. Emilio Rojas IIB, UNAM	VIII Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica
9:15 a 10:30	Cáncer Saúl Villa Treviño CINVESTAV				Mesa redonda: Revistas de Difusión de Bioquímica
RECESO					
10:45 a 12:15		Enzimas de alimentos. Isabel Guerrero Legarreta UAM-I	Citosinas en la fertilización. Guadalupe Maldonado Fac. de Medicina, UNAM	Drogadicción. Silvia Cruz CINVESTAV	
RECESO					
12:30 a 14:00	Genética. Alicia González IFC, UNAM	Anemias y vitaminas. Homero Hernández CMN Siglo XXI	Citoesqueleto. Mireya de la Garza CINVESTAV	Toxicología ambiental. Leticia Bucio UAM-I	
RECESO					
16:00 a 19:00	Taller organizado por el CINVESTAV				Ponencias Individuales

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO, A C

CONVOCATORIA

La Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo (SMBD) invita a los integrantes de la comunidad científica que realizan trabajo de investigación y difusión sobre tópicos relacionados con esta área, en México o fuera del país, a incorporarse como socios numerarios, correspondientes, honorarios o estudiantes de acuerdo con los siguientes requisitos:

I. Presentar por escrito su solicitud de admisión acompañada de su curriculum vitae y por dos cartas de apoyo extendidas por socios numerarios de la SMBD. En estas cartas, los firmantes deberán expresar claramente que les consta el interés del candidato por el estudio, investigación y difusión del conocimiento relacionado con la Biología del Desarrollo. También debe estipularse que los candidatos conocen y se comprometen a observar los estatutos de la SMBD.

II. Para incorporarse como socio numerario se requiere además:

a) Dedicarse al estudio e investigación en cualquiera de las ramas de la Biología del Desarrollo.
b) Haber publicado dos o más artículos de investigación sobre algún tema relacionado con la Biología del Desarrollo durante los últimos cinco años anteriores a su solicitud.

III. Se podrán incorporar a la SMBD en calidad de socios correspondientes, los solicitantes extranjeros que se encuentren trabajando en una institución fuera de la República Mexicana y que cumplan con los requisitos arriba señalados (I y II). También podrán incorporase en esta categoría los solicitantes extranjeros que realicen o hayan participado internacionalmente en labores editoriales en revistas de prestigio en esta disciplina o hayan desarrollado una labor significativa en sociedades internacionales de disciplinas afines a la misma.

IV. También se podrán integrar a la SMBD como socios honorarios, aquellas personas retiradas o jubiladas que realicen actividades administrativas, editoriales relativas a la docencia, investigación o la difusión de la Biología del Desarrollo o disciplinas afines. En este caso, los candidatos deberán ser propuestos por 10 socios, de los cuales cuando menos 6 deberán ser socios numerarios, que indiquen la conveniencia de la incorporación del candidato a la SMBD. La propuesta deberá acompañarse del curriculum vitae del candidato.

V. Los estudiantes inscritos en un programa de Posgrado respaldado por una institución académica de la República Mexicana, que realicen investigación en alguna disciplina relacionada con la Biología del Desarrollo, podrán formar parte de la SMBD como socios estudiantes. También podrán incorporarse en esta categoría aquellos estudiantes que se encuentren realizando su tesis de licenciatura sobre algún tópico relacionado sobe la Biología del Desarrollo. Los solicitantes deberán acompañar su solicitud de una Constancia actualizada de su situación académica y de un resumen de su proyecto de tesis avalado por su tutor académico.

VI. La fecha límite para presentar las solicitudes es el 30 de junio de 2000. Las solicitudes deberán ser enviadas a alguno de los integrantes de la Comisión de Membresía. El presidente y el secretario de esta Comisión presentarán por escrito sus recomendaciones a la Mesa Directiva de la SMBD, que a su vez las presentará a la Asamblea de Socios para su aprobación. La decisión de la Asamblea será comunicada por escrito al solicitante y a sus proponentes por el Presidente y el Secretario de la Mesa Directiva de la SMBD.

La Comisión de Membresía en turno está integrada por:

Dra Raquel Trejo Albarrán
Presidenta de la Comisión de Membresía y Vicepresidenta de la SMBD. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, CMN-SXXI. Av. Cuauhtémoc 300, Col Doctores. CP 06725. México, DF. Tel: 5627-6900 ext 4323 Fax: 5671-0952

Dra Graciela Meza Ruiz
Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Circuito Exterior de Ciudad Universitaria. CP 04510. México, DF. Tel: 5622-5588 Fax: 5622-5607

M en C Silvia Galván Huerta
Departamento de Biología Celular. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Circuito Exterior de Ciudad Universitaria. CP 04510. México, DF. Tel: 5622-3871 Fax: 5622-3897

Dr Samuel Gómez Aguirre
Departamento de Zoología. Instituto de Biología, UNAM. Circuito Exterior de Ciudad Universitaria. CP 04510. México, DF. Tel: 5622-5702

México, D.F., 3 de mayo de 2000.

IV Congreso Nacional de Biología Molecular en Medicina

Que se llevará a cabo durante la Reunión sobre Genética y Biomedicina Molecular 2000
Del 15 al 21 de octubre de 2000,
en Monterrey, N L
Tópicos: Genoma Humano, Terapia Génica, Vacunas, Diagnóstico Molecular, Nuevas Técnicas Moleculares, Biología Molecular en las Especialidades Clínicas.
Eventos: Curso Pre-Congreso, Conferencias Magistrales, Ponencias Orales, Ponencias en Cartel, Minisimposium, Actividades Socioculturales, Exhibición de Tecnología Científica.

Informes: página electrónica de la AMBMM
www.biomedicas.unam.mx/ambmm/

Comité Directivo

Dr Vicente Madrid Marina,
Depto Biología Molecular, CISEI, INSP
Cuernavaca, Morelos, MEXICO,
Fax: (73) 17-54-85
correo electrónico: vmarina@insp3.insp.mx

Dr Alejandro García Carrancá,
Depto de Biología Molecular, Inst de Investigaciones Biomédicas, UNAM
México, DF. MEXICO, Fax: (5) 622-38-91
correo electrónico: carranca@servidor.unam.mx

Dr José Moreno,
Lab de Inmunología, IMSS, Centro Médico Nacional Siglo XXI. México, D.F.
MEXICO, Tel: (5) 627-69-00 ext: 1608
correo electrónico: moreno@mail.internet.com.mx

Comité Local

Dr Hugo Barrera Saldaña,
Depto de Bioquímica, ULIEG, Fac Med, UANL
Monterrey, N L, MEXICO,
Fax: (8) 329-41-73
correo electrónico: hbarrera@uanl

Dra Cristina Rodríguez Padilla,
Lab de Inmunobiol y Virol, Fac Biol, UANL
Monterrey, N L, MEXICO,
Fax: (8) 352-42-12

Simposio "DNA Enzymes: Structures & Mechanisms"

Organizado por el Indian Institute of Sciences, en Bangalore, INDIA
Del 1 al 3 de diciembre de 2000.

Conferencias Magistrales y Carteles
Sesiones Científicas:
1. Endonucleasas de Restricción
- Estructura y Bioquímica.
2. DNA Metiltransferasas
- Estructura y Mecanismos.
3.Enzimas implicadas en la Recombinación Genética.
4. Interacciones entre Proteínas y ADN durante la reparación del ADN.
5. Mecanismos de Replicación del ADN.
6. Estructura Función y Mecanismos de Reacción de Topoisomerasas.
7. Endonucleasas
- Evolución y Nuevas Actividades.

Inscripción: 200 dólares (USD) antes del 15 de septiembre de 2000.
Fecha límite para la recepción de resúmenes: 15 de septiembre de 2000.

Más información en la página electrónica del Indian Institute of Sciences:
http://biochem.iisc.ernet.in
o directamente con:
Desirazu N Rao, Department of Biochemistry
Indian Institute of Science,
Bangalore - 560 012, INDIA
Tel: 91-80-309-2538
Fax: 91-80-360-0683 / 360-0814
Email: dnrao@biochem.iisc.ernet.in

V Nagaraja , Department of Microbiology & Cell Biology
Indian Institute of Science,
Bangalore - 560 012, INDIA
Tel: 91-80-360 0668, 91-80-309 2598
Fax: 91-80-360 2697 / 91-80-360 0683
Email: vraj@mcbl.iisc.ernet.in

XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A C

Acapulco, Gro

DEL 19 AL 24 DE NOVIEMBRE DEL 2000

PROGRAMA PRELIMINAR DEL CONGRESO

DOMINGO 19	HORARIO	LUNES 20	MARTES 21	MIÉRCOLES 22	JUEVES 23	VIERNES 24
	8:15-9:15 Conferencias Magistrales	Dra. Rocío Sierra, Yale Univ. USA	Dr. Armando Aranda, UAEM	Dr. Mauricio Montal, Univ. California, USA	Dr. Joaquín V. Arribas López Hosp. Gral. Vall d´ Hebron, Barcelona	Dr. Enrique Soto, INN "SZ"
	9:15-9:30	RECESO				
I N S C R I P C I O N E S	9:30-11:00 Simposia Plenarios	Plantas Alfredo Herrera Estrella	Genoma Julio Collado	Bioenergética Marietta Tuena	Biol. Mol. y Cel. de Hongos Jesús Aguirre	Inmunología Sergio Estrada Parra
	11:00-11:30	CAFÉ				
	11:30-13:00 Simposia Plenarios	Procariontes Fernando Bastarrachea	Financiamiento para Invest Gladys Faba	Neuroquímica Ricardo Tapia investigación Sergio Estrada-Orihuela	Relación industria-	Toxicología Guillermo Elizondo
	13:00-16:00	COMIDA				
	16:00-18:00 Simposia Simultáneos	Genética I Carmen Gómez Est. Fun. Membra. I Isabel Baeza Est. Fun. Macro I Arturo Rojo Metabolismo I Victoria Chagoya	Bioq. Fisiol. Micro. I Juan. P. Laclette Des. Dif. Cel. I Alfonso Cárabez Inmunología I Iris Estrada Trans. Sin. Neuro. I Sergio Sánchez	Tarde libre	Genética II Miguel Gómez Est. Fun. Membra. II Luis González Est. Fun. Macro II - Juan Luis Rendón Metabolismo II Marco A. Juárez	Bioq. Fisiol. Micro. II Mireya de la Garza Des. Dif. Cel. II Dr. Luis Miguel Salgado Inmunología II Rubén López Trans. Sin. Neuro. II Mauricio Díaz Muñoz
Inauguración	18:00-18:30	CAFÉ				
Conferencia Inaugural Dr. Armando Gómez Puyou 17:00-18:00 Recepción de 18:15-19:00	18:30-23:00	Carteles NONES	Carteles NONES Sesión de Negocios 20:00 a 21:00		Carteles PARES	Carteles PARES
						Cena-clausura 22:00

EL COMITÉ ORGANIZADOR DEL XXIII CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA MESA DIRECTIVA 1999-2001

Dr Edmundo Chávez Cossío,
Tel: 5573-29-11; Fax: 5573-09-26;
echavez@cenids.ssa.gob.mx

Dr Federico Martínez Montes,
Tel: 5623-21-68, Fax: 5616-24-19,
fedem@servidor.unam.mx, o
fedem@laguna.fmedic.unam.mx

Dr Heliodoro Celis Sandoval,
Tel: 5622-5667, Fax: 5622-5611,
hcelis@ifisiol.unam.mx

Dra Gloria Soberón Chávez
Tel: (5) 6227629/ 6227634, Fax: (73) 172388
correo electrónico: gloria@ibt.unam.mx

DUDAS O COMENTARIOS

En caso de tener alguna duda o comentario, por favor comuníquese con la **Sra Guadalupe Ramírez**, a los teléfonos 5622-5603 y 5622-5604, Fax: 5616-2282, o al correo electrónico secdir@ifisiol.unam.mx

Para información, visite la página en Internet de la Sociedad Mexicana de Bioquímica en la siguiente dirección:

http://ifcsun1.ifisiol.unam.mx/smb/

XX Congreso Latinoamericano de Fisiología

Del 3 al 7 de septiembre de 2000,

en la ciudad de Cancún,
Quintana Roo, México.

Información completa en:
hhtp://www.servimed.com.mx

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO, A.C.

C O N V O C A T O R I A

La Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo, con el fin de estimular y promover el estudio de la biología del desarrollo **Convoca al Concurso de elaboración del Logotipo de la Sociedad, bajo las siguientes**

B A S E S

1. Podrán participar estudiantes de cualquier nivel de escolaridad.
2. Un autor sólo puede presentar un trabajo.
3. Los trabajos deben presentarse a tinta, en blanco y negro, en un tamaño máximo de 20 x 30 cm, considerando que será reducido a un tamaño de 4 x 4 cm.
4. El resultado se dará a conocer vía telefónica o fax a partir del 28 de agosto de 2000.
5. El mejor trabajo elegido por el Jurado obtendrá un premio de $5000.00 (CINCO MIL PESOS).
6. El ganador cederá sus derechos a la Sociedad y el trabajo será el logotipo de la misma.
7. Los trabajos no seleccionados se devolverán a solicitud de los interesados.
8. Los trabajos deberán ser enviados con un seudónimo. En sobre cerrado se enviará la información completa del (los) autor (es) (nombre, dirección, teléfono, constancia de estudiante, etc.).

El sobre rotulado con el seudónimo deberá ser enviado o entregado personalmente a:

Dr Julio Morán y/o Dra Rocío Salceda
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Circuito Exterior S/N
Ciudad Universitaria
CP 04510 México, DF

9. Esta convocatoria entra en vigor a partir de la fecha de publicación y tendrá como límite para la recepción de trabajos el 31 de julio de 2000.
10. Cualquier punto no previsto en la presente convocatoria será resuelto por los organizadores y los miembros del Jurado.

México, DF, a 15 de mayo de 2000.

A LOS LECTORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

DONATIVO ANUAL 2000

El BEB está en su décimo noveno 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 (doscientos pesos), que hará posible continuar con la elaboración y distribución del volumen 19 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

INTERESADOS EN PERTENECER A LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C

Para quienes deseen formar parte de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A C, les recordamos que de acuerdo al artículo 36° de los estatutos que rigen a la Asociación, los candidatos deberán ser profesionales que ejerzan la docencia de bioquímica en cualquier centro de educación a partir del nivel medio superior.

Los interesados en ser miembros numerarios de nuestra Asociación deberán enviar una carta solicitando su ingreso a la Asociación junto con su curriculum vitae. Esta solicitud deberá ir acompañada por dos cartas de apoyo de dos miembros numerarios. Cada solicitud será evaluada por la Comisión de Admisión que se reúne una vez al año y emite su dictamen que será hecho público durante la sesión regular de negocios que se realiza durante el Congreso de la Asociación. Antes de ser aceptado no es necesario hacer pago alguno en referencia a la membresía. Si no conoce a ningún miembro que pueda apoyar su solicitud háganoslo saber y envíe su solicitud al:

Dr Alejandro Zentella
Apartado Postal 70-243
México DF 04510 México
Fax: 5622-5611
Correo electrónico: azentell@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

CORRESPONSALES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C o suscriptor del BEB y vives fuera de la Ciudad de México, te invitamos a que seas corresponsal nuestra revista en el sitio donde radiques.

Nos interesa contar con corresponsales adscritos a las Instituciones de Educación Superior en todos los estados de la República, así como en lugares de Centro y Sudamérica, España y otros sitios en donde el BEB sea leído.

También nos interesa conocer y publicar las noticias más significativas que en nuestro campo, ocurran en los diferentes lugares, ya sean seminarios, cursos, congresos, talleres, publicaciones, etc.

En el documento Normas del Comité Editorial, que es el que nos rige, hay un apartado para esta actividad, mismo que a continuación se transcribe:

5. DE LOS CORRESPONSALES

5. a) Los corresponsales del BEB son profesores y/o investigadores, que sin formar parte del Comité Editorial, coadyuvan en las actividades de la revista. El corresponsal debe ser un miembro sobresaliente de la comunidad académica local o regional. Es deseable un corresponsal en cada una de las Instituciones de Educación Superior de la República Mexicana, Centroamérica, Sudamérica y otras regiones de habla hispana.

5. b) Uno de los editores se encargará de la coordinación de los corresponsales y de la comunicación con ellos para lograr que los objetivos se cumplan. El puesto será rotatorio y se cambiará cada dos o cuatro años, de acuerdo con el Comité Editorial.

5. c) La proposición de corresponsales se hará, mediante documento firmado por cuando menos dos de los editores, que se acompañará con el *Curriculum Vitae* del candidato propuesto.

5. d) La discusión del ingreso de un corresponsal deberá realizarse después de que el Coordinador de Corresponsales haya circulado la información correspondiente y con la asistencia en pleno del Comité Editorial.

5. e) Para ser aceptado, el candidato deberá contar con la aprobación por consenso de los miembros del Comité Editorial.

5. f) En caso de ser admitido, se le hará una invitación formal a la que se anexarán estas normas. Iniciará sus actividades como corresponsal, al recibir el Editor en Jefe la aceptación escrita del candidato.

5. g) El Comité Editorial dará el crédito correspondiente a los corresponsales en la revista en el formato que el propio Comité decida.

5. h) La salida de un corresponsal puede ser por renuncia voluntaria, presentada por escrito, o bien por acuerdo del Comité Editorial, después de la evaluación de sus actividades.

5.1 RESPONSABILIDADES DE LOS CORRESPONSALES

5.1.a) Envío a través del Coordinador de Corresponsales de al menos una contribución propia o de su comunidad al año y de las noticias relevantes de su localidad o región.

5.1.b) Mantenimiento del archivo de los suscriptores del BEB de su localidad y comunicación inmediata de los cambios en él.

5.1.c) Colaboración en la promoción, difusión y distribución del BEB entre los miembros de su comunidad.

5.1.d) Colaboración en las promociones de financiamiento económico de la revista.

5.1.e) Elaboración y envío anual de un informe de sus labores que a través del Coordinador de Corresponsales se hará llegar al Comité Editorial junto con una crítica a los números correspondientes.

Por favor, dirige tú correspondencia a la Coordinadora de Corresponsales, Comité Editorial del BEB, Apartado Postal 70-281, México, 04510, DF, MÉXICO, o bien a: Tel: (52) 5623-2168 / Fax: (52) 5616-2419.
email: balmori@laguna.fmedic.unam.mx

Yolanda Saldaña Balmori
Coordinadora de Corresponsales del BEB.

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 **"Wordperfect"**, 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 1999.

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 específica 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.

BEB 2000 Vol 19 Núm 3 Septiembre de 2000

CONTENIDO

EDITORIAL

SE ESTABLECE UN NUEVO PROGRAMA DE VINCULACIÓN ENTRE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA 136

ARTÍCULOS

FUNCIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA
Blanca A. Delgado Coello y Jaime Mas-Oliva 138

LA PARTICIPACIÓN DEL EFECTO HIDROFÓBICO Y DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO INTRAMOLECULARES EN LA ESTABILIDAD CONFORMACIONAL DE LAS PROTEÍNAS
Oscar Flores-Herrera, Juan Pablo pardo y Federico Martínez 146

EL PAPEL DEL POTASIO DURANTE LA ISQUEMIA
Vicente Castrejón Téllez 158

FOSFATASAS DE PROTEÍNAS: MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN
Rocío Alcántara Hernández 164

NUEVAS ACCIONES DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS
Martha Zentella de Piña, Lenka Pimentel Velázquez, Héctor Vázquez Meza, Guadalupe Piña Zentella y Héctor Riveros Rosas 174

OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA
Marcela Varela Gómez y Rafael Sánchez Moreno 182

CRUCIBIOQ. QUÍMICA DE LIPIDOS
Yolanda Saldaña Balmori 183

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO 184

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ 186

CONVOCATORIAS

IV SIMPOSIO ESTRÉS OXIDATIVO EN BIOMEDICINA. Invitación 187

SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2000. Anuncio 188

XXVII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA 189

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO, A C. Invitación 190

CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES 191

XXIII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA, A C 192

XX CONGRESO LATINOAMERICANO DE FISIOLOGÍA 193

A LOS LECTORES DEL BEB
Donativo Anual 2000 194

CORRESPONSALES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 195

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 196