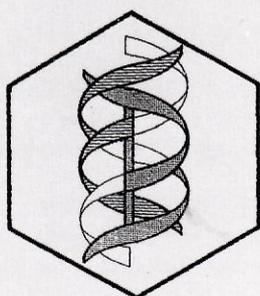
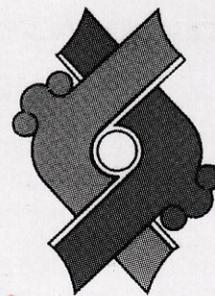


BEB 2001

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).

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"

ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

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

MARIVEL ROJAS GARCÍA

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

JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO

Instituto de Ciencias Básicas "Victoria de Girón"
Instituto Superior de Ciencias Médicas, La Habana, Cuba

GUADALUPE OLIVA

Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros, Tamps.

KATERINA LIRA RUÁN

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor.

ARMANDO FRANCISCO VARGAS ALBORES

Biotecnología Marina
Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo de Sonora

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

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

SILVIA DE VARS 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

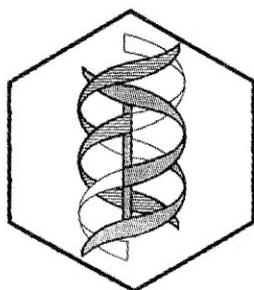
HORACIO REYES VIVAS
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

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. Certificados de: Licitud de Título No 6703; Licitud de Contenido No 6989; No de expediente 1/432"92"/8443; Reserva al título en derecho de autor No 6703. Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIÓDICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,5 00 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP09-0403; UNAM-Depto de Bioquímica y Facultad de Medicina.

El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente la del Comité Editorial.

EDITORIAL

LA BIOENERGÉTICA DEL SIGLO XXI

La bioenergética es la rama de la bioquímica que estudia los procesos bioquímicos y biofísicos de interconversión de energía en la célula viva. Sin embargo, para la mayoría de los investigadores, maestros y estudiantes, la bioenergética ha sido por muchos años sinónimo de ATPasa mitocondrial y de transporte de Ca^{2+} , sobre todo aquí en México. Los avances recientes en el entendimiento de su función han colocado a la ATP sintetasa /ATPasa mitocondrial nuevamente en la categoría de problema central de la bioquímica. Precisamente el otorgamiento del Premio Nobel a Paul Boyer y a John Walker en 1997 por sus descubrimientos del mecanismo rotatorio de la enzima, ha impulsado el resurgimiento de la bioenergética. Dos artículos recientes que aparecen en los números 19-4 y 20-1 del *Boletín de Educación Bioquímica* por Pacheco-Moisés y Cols y por Pardo y Cols, respectivamente, revisan a profundidad, pero de una manera clara y didáctica, el difícil tema del funcionamiento de la ATPasa de H^+ y su regulación.

Otro problema central de la bioenergética es el esclarecimiento de los mecanismos de transporte de H^+ de los complejos oxidorreductores de las cadenas transportadoras de electrones. Con la ayuda de la cristalización de los complejos respiratorios de los citocromos b-c₁ y a-a₃ y de su análisis por difracción de rayos x, además de la aplicación de herramientas de la biología molecular, se ha logrado la identificación de las rutas utilizadas para el movimiento de H^+ a través de las proteínas, acoplado a las reacciones de oxidorreducción. En este número y el próximo del BEB, otra vez Pardo y Cols revisan algunos de los datos más recientes acerca del funcionamiento de varios complejos respiratorios. Esperamos que los lectores del BEB encuentren estos trabajos informativos e ilustrativos del estado actual de la bioenergética. Cabe mencionar que el mecanismo de acoplamiento entre la síntesis de ATP y la generación de un gradiente electroquímico de H^+ por la cadena transportadora

de electrones todavía no es un asunto decidido y completamente esclarecido. El modelo original de Peter Mitchell (Premio Nobel 1977) del acoplamiento quimiosmótico deslocalizado, en el cual los protones expulsados por un complejo redox están instantáneamente disponibles a cualquier ATP sintetasa, es un mecanismo validado por abundante evidencia experimental, pero no es, al parecer, el único mecanismo de acoplamiento. También se ha propuesto la existencia de un acoplamiento localizado, en el cual los protones movilizados por los complejos redox se canalizan a través de rutas intramembranales hacia la ATP sintetasa. Nosotros visualizamos que en los próximos años, se establecerán con certeza los detalles moleculares de esta ruta alternativa de síntesis de ATP.

La gran capacidad adaptativa de muchos microorganismos reside en gran parte en su habilidad para generar ATP en condiciones ambientales extremas, usando rutas alternativas de transporte de electrones y expulsión de H^+ (o de Na^+). La identificación y caracterización de las cadenas respiratorias alternativas en bacterias y protistas es otro de los temas en el que los grupos de investigación mantienen una feroz competencia por ser los primeros en descubrir sus propiedades. En los dos números anteriores del BEB, Covián y Jasso-Chávez y Cols publicaron sendas revisiones sobre este tema que esperamos hayan sido de interés para los lectores de nuestra revista.

Otros aspectos relevantes del desarrollo de la bioenergética moderna son los concernientes al análisis cuantitativo del control del metabolismo energético (v.g. glicolisis, ciclo de Krebs, oxidación β de ácidos grasos, fosforilación oxidativa, ciclo de Calvin, fotofosforilación), tanto en mitocondrias y cloroplastos aislados como en células y órganos intactos. En las últimas dos décadas, la investigación de la bioenergética celular ha

cambiado, de realizar experimentos con preparaciones crudas de los organelos a enfoques moleculares directos. La aplicación de técnicas no invasivas tales como la resonancia magnética nuclear y el uso de sondas fluorescentes permeables, ha permitido aventurarse en el estudio de sistemas biológicos más complejos como son las células intactas. La obtención de información sobre la bioquímica de las mitocondrias trabajando en su ambiente natural (dentro de la célula) es claramente de mayor significado biológico que los datos obtenidos, profusamente, de los organelos aislados. Se tiene contemplado publicar en fecha próxima una revisión sobre este tema, con particular énfasis en el control de la fosforilación oxidativa en células tumorales.

En los últimos años se ha descubierto que las mitocondrias tienen una función esencial en varias patologías. La homeostasis de la función

mitocondrial como generadora de ATP, moduladora del estado redox celular y del nivel de radicales libres del oxígeno, o como reservorio de cationes metálicos (Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} en neuronas), entre otras, es de vital importancia para la preservación de la célula y para evitar daños irreversibles durante episodios de anoxia (isquemia) y reperfusión. Además, alterar la función mitocondrial puede acarrear señales de iniciación de muerte celular programada o apoptosis y de necrosis celular. Nosotros invitamos a los lectores del BEB que estudian en sus laboratorios algunos de estos problemas, a que escriban revisiones actualizadas sobre estos apasionantes temas de la bioenergética del siglo XXI.

Rafael Moreno Sánchez.
Instituto Nacional de Cardiología
"Dr Ignacio Chávez"

LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES Y LA COMPLEJIDAD DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Juan Carlos Raya Pérez. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad de Biotecnología de Plantas e Ingeniería Genética, Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Km 9.6 Libramiento Norte carretera Irapuato-León. Apdo. postal 629. Correo electrónico: jraya@ira.cinvestav.mx

Recibido: 5 de septiembre de 2000. Aceptado: 14 de noviembre de 2000.

RESUMEN

Los sistemas de dos componentes, con actividad de histidin-cinasa, se encuentran en bacterias, hongos y plantas. Los receptores de animales y el fitocromo de plantas tienen similitud estructural con las histidin-cinasa, pero su actividad es de serin-treonin-cinasa, lo que hace pensar en las histidin-cinasa como en proteínas ancestrales. Los conocimientos sobre la histidin-cinasa Che A, el regulador de respuesta Che Y y el quimiorreceptor Tar permiten una buena aproximación para entender aspectos relacionados con la estructura-función de una vía de transducción de señales.

PALABRAS CLAVE: histidin-cinasa, quimiotaxis, Che A, Che Y, Tar, etileno, regulador de respuesta.

ABSTRACT

The two component system are in bacteria, fungi and plants. Animals receptors and phytochrome in plants are similar to protein histidine-kinase. However they have serin-threonin kinase activity, this has allowed to think that two components systems are ancestrals. The study of histidine kinase Che A, response regulator Che Y and chemoreceptor Tar permit a good approximation to understand the structure-function aspects of a signal transduction pathway.

KEY WORDS: histidine-kinase, Che A, Che Y, Tar, ethylene, response regulator.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de dos componentes intervienen en una gran variedad de respuestas celulares como la quimiotaxis, la osmorregulación, la esporulación y la patogénesis; reciben este nombre porque constan de una proteína con actividad de cinasa que se autofosforila sobre un residuo de histidina, y un regulador de respuesta que toma el fosfato de la histidina y lo transfiere a un aspartato localizado en

el propio centro catalítico del regulador de respuesta. (1,2).

En los sistemas más sencillos el regulador de respuesta es una proteína capaz de unirse al ADN y así regular la expresión genética. La que se conoce como cinasa híbrida consiste de un dominio espaciador de membrana en el extremo amino-terminal, seguido del dominio histidin-cinasa y con el regulador de respuesta comprendiendo el extremo carboxilo-terminal, es decir, en la misma proteína están la cinasa y el regulador de respuesta (un dominio es una parte de la proteína que se puede plegar independientemente de las secuencias vecinas, aunque el concepto puede variar dependiendo del autor). Estas cinasas híbridas tienen, además, reguladores de respuesta por separado (Fig.1)(3); puede haber varias histidin-cinasa interactuando con un regulador de respuesta, y varios reguladores de respuesta que se fosforilan a partir de una sola histidin-cinasa, en algunos casos la unión del ligando estimula la actividad de cinasa y en otros la inhibe. Los procesos en los que participan pueden durar milisegundos como en la quimiotaxis, segundos o incluso horas, como en la esporulación (1).

En *Escherichia coli* hay más de 30 sistemas distintos de este tipo: como la proteína Arc B que está unida a la membrana y es un sensor de tipo híbrido con su propio regulador de respuesta en el carboxilo-terminal; además, hay un regulador de respuesta independiente llamado Arc A que se une al ADN. Si se le quita el regulador de respuesta a la cinasa híbrida se altera la fuerza de la regulación, pero no se suprime. Este sistema funciona bajo anaerobiosis y su regulación, como la de otros sistemas de este tipo, no parece ser del tipo todo o nada, aunque dado que una cinasa puede sustituir a otra y lo mismo parece ser cierto para algunos reguladores de respuesta, la actividad observada podría deberse a esto, o al hecho de que algunas mutaciones podrían ser letales y, por lo tanto, no observarse.

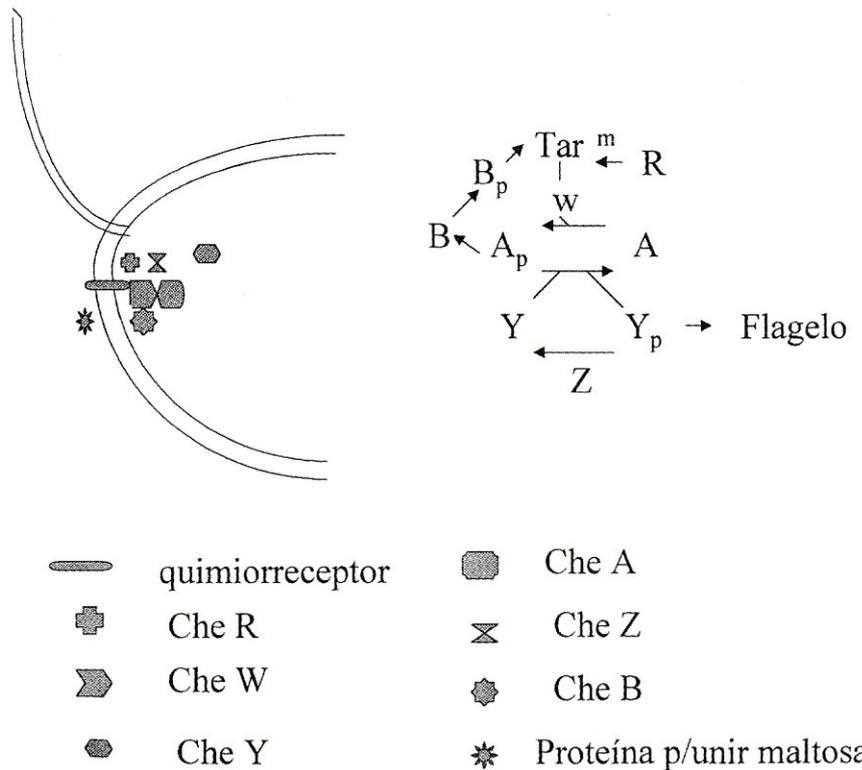


Figura 1. El receptor (Tar) sin ligando interactúa con Che W (el adaptador) y permite la fosforilación de Che A, que transfiere el fosfato a Che Y (el regulador de respuesta) que interactúa con el flagelo para que rote en el sentido de las manecillas del reloj. Cuando se une el aspartato al receptor inhibe la fosforilación de Che A, Che Z (una fosfatasa) desfosforila a Che Y permitiendo al flagelo rotar en sentido contrario a las manecillas del reloj, dando un avance suave en dirección del atrayente. La metilación del receptor por Che R (una metilasa) aumenta la fosforilación de Che Y pero la fosforilación de Che B incrementa su actividad resultando en la desmetilación del receptor; el receptor es metilado cuando tiene ligando unido, y el ligando unido provoca una supresión de su actividad, por lo que la metilación ayuda a superar esta baja en la actividad del receptor. Che B y Che R ayudan a mantener en un nivel constante la actividad de Che A dependiendo de la concentración del atrayente.

QUIMIOTAXIS

En *E. coli* el movimiento de los flagelos en sentido contrario a las manecillas del reloj permite que la bacteria navegue suavemente, y cuando lo hacen en el sentido de las manecillas es como si se diera un viraje, la célula da tumbos y cambia de dirección; ambos movimientos se alternan de tal manera que la bacteria se dirige correctamente hacia los atrayentes como aminoácidos, azúcares, proteína o huye cuando detecta sustancias tóxicas.

La cinasa Che A forma complejos estables con varias proteínas, incluido el receptor de aspartato Tar, Che W que es conocido como el adaptador, con

otros tres receptores, entre ellos Tsr; el receptor del aspartato también interviene en la respuesta a maltosa al interactuar con la proteína que une a este azúcar; está además el regulador de respuesta Che Y, otra proteína llamada Che R que se encarga de metilar al receptor, Che B encargada de desprender los metilos, Che Z que es una fosfatasa que desfosforila a Che A, y todo el complejo se mantiene unido a la membrana (4). La interacción de una cinasa con varios receptores parece ilustrar un principio de economía de la célula, que no desperdicia en cinasas para cada receptor, sino que utiliza una misma para todos.

La unión del aspartato al receptor Tar disminuye unas 300 veces la autofosforilación de Che A, lo que disminuye a su vez la transferencia de fosfato a Che Y, el regulador de respuesta; si Che Y no está fosforilado el flagelo rota en el sentido contrario a las manecillas del reloj y la bacteria navega suavemente dirigiéndose a la zona donde se concentra el nutriente. El

receptor, con el aspartato unido, es metilado por Che R, lo que provoca un aumento en la actividad de

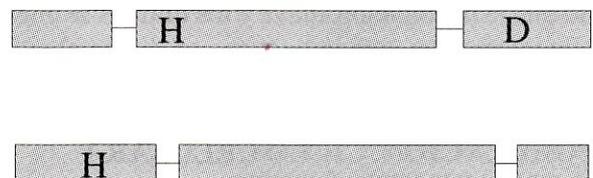


Figura 2. Arriba, una cinasa híbrida en la que el residuo de histidina (H) y el de aspartato (D), que son fosforilados, se localizan en la misma proteína. Abajo, una cinasa (Che A) con el residuo de histidina señalado. El regulador, en este caso Che Y, no está unido a la proteína.

fosforilación de Che A, aunque el receptor metilado es menos eficaz para transmitir la señal; Che B cuando esta fosforilada retira los metilos del receptor, y Che A fosforila a Che B. La fosforilación de Che A provoca que el flagelo rote en el sentido de las manecillas y provoca un cambio en la dirección de nado. La metilación es más lenta que la interrupción de la actividad de cinasa de Che A, lo que deja tiempo para que la bacteria navegue en la dirección adecuada, además, la fosfatasa Che Z, que desfosforila a Che A, interviene en la regulación; Che B fosforilado

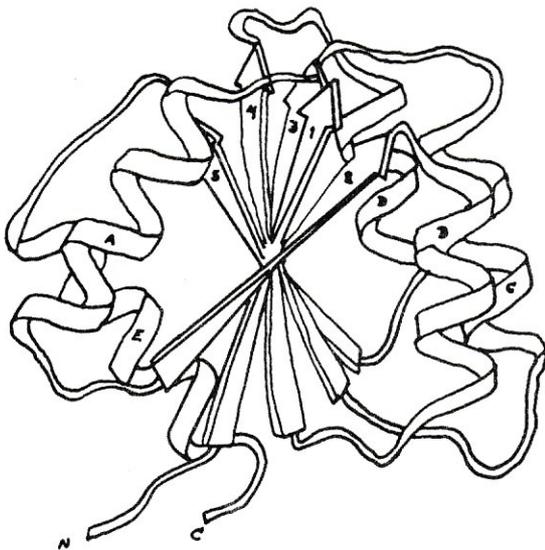


Figura 3. Estructura terciaria de Che Y, el regulador de respuesta, una proteína de un solo dominio, compuesta de cinco tiras β rodeadas por cinco α -hélices.

tiene una vida media de cinco segundos, por lo que es una especie de fosfatasa que compite con Che Y por los fosforilos de Che A. Las actividades de la fosfatasa y la metil esterasa regulan el sistema de tal modo que la navegación suave y los tumbos se alternan de tal manera que la bacteria se dirige al sitio adecuado (5,6,7).

ESPORULACIÓN, CICLO CELULAR Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO

En *Bacillus subtilis* hay tres histidín-cinasas involucradas en regular el proceso de esporulación; las tres transfieren el fosfato al regulador de respuesta SpoOF, que a su vez lo transfiere a SpoOB, que completa la cadena al pasarlo al regulador trans-

cripcional maestro SpoOA. Hay dos fosfatasa, llamadas Rap A y Rap B, que desfosforilan a SpoOF, y otra, SpoOE, que actúa sobre SpoOA; estas actividades regulan la concentración de la forma fosforilada del regulador transcripcional SpoOA. En *Caulobacter crescentus* existe un sistema similar que regula la diferenciación y el ciclo celular (4). En *Rhizobium meliloti* y en *Bradyrhizobium japonicum* hay sensores de dos componentes que regulan la expresión de genes que intervienen en la fijación de nitrógeno. La nitrogenasa es anaeróbica y su síntesis es reprimida en presencia de oxígeno; el amino terminal de FixL tiene un hemo que sirve como sensor de éste, mientras que en el carboxilo-terminal está el dominio cinasa, cuya actividad es estimulada cuando no hay oxígeno unido al hemo, que es cuando se expresan los genes para la fijación de nitrógeno; FixL fosforila a FixJ, un regulador de respuesta que es un factor de transcripción. En *R. meliloti* la proteína está anclada a la membrana, en tanto que en *B. japonicum* la proteína es soluble.

En *Azotobacter vinelandii* la vía que está implicada en la represión de los genes de fijación de nitrógeno tiene una proteína, NiFL, que modula la actividad del factor transcripcional NiFA; la NiFL es una flavoproteína con FAD unido, que es el que actúa como sensor del oxígeno, hay componentes flujo arriba no determinados aunque al parecer incluyen proteínas con grupos hemo.

MOVIMIENTOS PROTEICOS

Tar.

El quimiorreceptor Tar es un homodímero en el que cada subunidad pesa alrededor de 60 kDa y posee cuatro α -hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) que forman un paquete entre ellas; cada subunidad consta de dos segmentos transmembranales llamados TM1 y TM2, en el primero se localiza el extremo amino-terminal y el segundo conecta los dos dominios citoplásmicos. La $\alpha 1$ de TM1 y la $\alpha 1'$ de TM1' forman la interfase entre las dos subunidades y son prácticamente estáticas (Fig. 4).

El dominio periplasmático es un paquete de cuatro hélices y los sitios de unión del aspartato están en la interfase entre las subunidades del dímero; la unión del aspartato provoca cambios conformacionales en el receptor, pero no afectan la dimerización pues el entrecruzamiento del dímero me-

dianete enlaces disulfuro no impide su funcionamiento; este mismo tipo de enlaces entre las hélices espaciadoras de membrana de una sola de las subunidades entran al receptor en el modo activado (on) o inactivado (off), independientemente de si está o no unido el ligando (Fig. 4).

Además del paquete de cuatro hélices constituido por las pertenecientes a un monómero, la 1' y la 4' forman casi otro paquete con las de su subunidad par y las mutaciones entre estas hélices tienen diversos efectos en la actividad.

La sustitución de un solo aminoácido (A19K) en TM1 impide el señalamiento de Tar sin bloquear la unión del ligando; entre muchos supresores encontrados hay cuatro que son intragénicos de A19K (lisina por alanina) que causan sustituciones en TM2; la mutación también puede ser suprimida introduciendo residuos negativamente cargados (asp o glu) en la posición 205 o aspartato en la 201 lo que sugiere que la supresión intersubunidades de A198E (glutamato por alanina) se debe a la formación de un puente de sal entre TM1 y TM2'.

El δ -carboxilo del glutamato de la primera clase de supresores, probablemente forma un puente salino intersubunidades con el ϵ -amino de la lis 19', que cargada positivamente en su cadena lateral, puede perturbar el empaquetamiento normal de las cuatro hélices TM (TM1, TM1', TM2, TM2'), y la introducción del residuo cargado negativamente en TM2' puede permitir el empaquetamiento al formar un puente de sal entre TM1 y TM2'. Un residuo de aspartato en la posición 198 puede no extenderse lo suficiente para formar el puente de sal con la lis 19', o, si lo forma, afecta la estructura y función del receptor. La interacción hidrófoba entre TM y TM2' es importante para la arquitectura del receptor, y un puente de sal que neutralice las cargas puede restaurar las interacciones. Los puentes de sal interhélices pueden tener otra función en la transducción de la señal: restringir los movimientos de TM1 y TM2', uno con respecto al otro.

Desde el dominio periplasmático al dominio citoplasmático, Tar abarca alrededor de 380 Å con una distancia de 25 Å; las α -hélices son resistentes a la compresión o a la extensión, y pueden por lo tanto, transmitir un pequeño cambio conformacional a gran

distancia, como lo requiere el receptor; este movimiento puede empujar una porción de la proteína fuera de la membrana plasmática, disparando la cascada de fosforilaciones. Hay movimientos intra e intersubunidades; siendo los primeros suficientes para el señalamiento; los movimientos son de tipo pistón, hacia abajo, de TM2 en relación a TM1. Este tipo de movimiento se detectó cuando residuos previamente identificados fueron mutados a cisteínas y se marcó el spin con metanotiosulfonato y se detectaron cambios en la distancia spin-spin intrasubunidad.

La unión de Che A y Che W al dominio transmembranal del receptor también provocan cambios conformacionales, pero no afectan el tipo de cambio conformacional inducido por el aspartato. Otros receptores podrían utilizar este tipo de movimiento para llevar a cabo su función en la conducción de la señal.

Che A

Che A es una proteína modular con tres dominios distintos: uno de dimerización, otro con actividad cinasa y otro de acoplamiento al regulador. El dominio cinasa y el regulador están alrededor de un paquete central de cuatro hélices y no hay contactos entre los dominios cinasa o entre los dominios reguladores.

El dominio de dimerización está dominado por dos hélices antiparalelas que se empaquetan contra las dos hélices análogas de la segunda subunidad para formar el paquete central de cuatro hélices. El segundo dominio, responsable de la actividad cinasa, es un

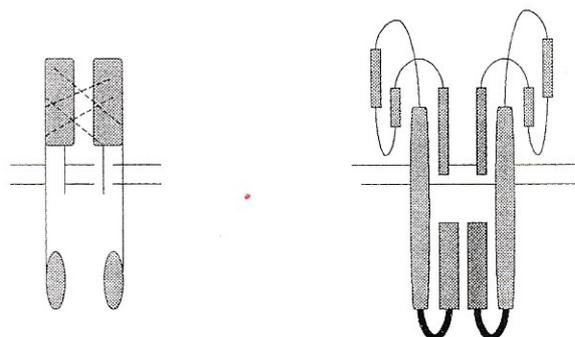


Figura 4. A la izquierda se señalan, con líneas punteadas, los dos sitios de unión para el aspartato formados por las dos subunidades en el espacio periplasmático. A la derecha se muestran los cuatro segmentos transmembranales.

emparedado α - β compuesto de una hoja de cinco tiras β y seis α -hélices.

Hay una intensiva interfase de dimerización hidrofóbica en Che A que crea una barrera energética para la disociación de las subunidades; este dominio tiene 97% de la superficie cubierta de cada subunidad en la interfase dimérica.

La formación del dímero y el dominio de dimerización pueden ser muy importantes en la regulación de la actividad de señalamiento.

Las interacciones limitadas entre los dominios cinasas y de dimerización y las diferencias en la posición relativa que tienen dentro de cada subunidad del dímero y regiones conservadas con movimiento de tipo bisagra indican que estos movimientos relativos son una característica esencial en el señalamiento de las histidín-cinasas con multidominios. En una subunidad, la interacción entre el dominio cinasa y el de dimerización es dominado por un puente de sal. El movimiento de dominios cerca de un gozne, o bisagra, puede permitir la regulación de la cinasa por el quimiorreceptor y por Che W. En las proteínas, las interacciones entre caras internas, como las que están entre α -hélices, se hallan fuertemente empaquetadas en una conformación de baja energía que permite sólo pequeños movimientos en la interfase, de tijera o de bisagra, dependiendo de si involucran o no el deslizamiento de una con respecto a la otra, aunque hay combinaciones de estos movimientos; el de tijera es generalmente de 2 Å de translocación y 15 grados de rotación.

Dos distintos arreglos de los dominios indican un movimiento de tijera del dominio regulatorio y del de

dimerización. Estos dominios pivotean cerca de una interfase conservada que involucra residuos invariables (5,6,7,8).

Los movimientos dentro del receptor, debido a cambios provocados por la unión del ligando, pueden ser propagados de Che W a P5, que puede actuar como un seguro para el acceso de P1, que es el dominio con actividad de cinasa, al sitio de unión del ATP al cambiar su orientación en relación al dominio de dimerización, al dominio cinasa y a Che W. La hidrólisis del ATP está ligada al movimiento relativo de una subunidad. La histidina que se fosforila está localizada en P1. El dominio P2, que es el dominio específico de reconocimiento del regulador de respuesta, está insertado entre P1 y el dominio cinasa y acerca a los aceptores del fosforilo (como Che Y) a este dominio cinasa. La unión del fosfato puede causar un cambio estructural en la proteína pues el fosfato, cargado negativamente, atrae aminoácidos con carga positiva en sus cadenas laterales. La histidina y el aspartato, como aminoácidos libres, son moléculas de alta energía, con el equilibrio desplazado hacia la forma desfosforilada. La fosforilación de la histidina es casi independiente de la proteína de la que forme parte en términos energéticos y libera una gran cantidad de energía al desfosforilarse, empujando así la fosforilación de su sustrato; para el aspartato, la energía libre de fosforilación depende del ambiente en que se encuentre en la proteína, dando lugar a que el grupo fosfato interactúe con la propia proteína y dispare cambios conformacionales (2).

El dominio P2 interactúa preferencialmente con la forma no fosforilada de Che Y y la unión de P2 facilita la transferencia del fosfato al abrir el sitio activo

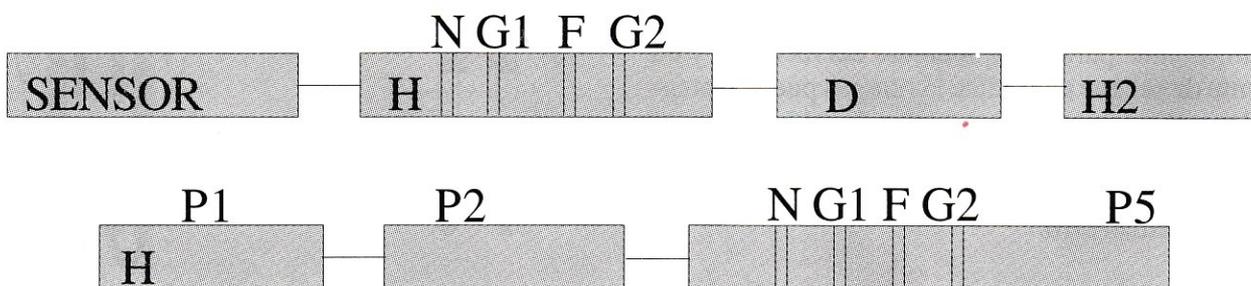


Figura 5. Arriba, histidín-cinasa donde se muestra la posición de la histidina (H) con respecto al dominio cinasa. N, G1, F y G2 son secuencias conservadas. Abajo, la cinasa Che A donde se muestra la posición de la histidina (H) con respecto al dominio cinasa y a los dominios P1, P2, P5.

de Che Y para que sea fosforilado por Che A. Hay dos modos de unión entre Che Y y el dominio P2, en uno se forman nueve puentes de hidrógeno y en otro 6, y podría haber un tercer modo de unión.

Además este dominio P2 de Che A tiene una tirosina localizada en una cinta β que interacciona con el cuerpo basal del flagelo y por lo tanto probablemente interviene en los cambios de dirección en la rotación del flagelo.

No hay un código de aminoácidos usados para el reconocimiento de la cinasa, que fueran los mismos por ejemplo en Che Y y en Che B, lo que habla de la flexibilidad estructural como algo muy importante en las interacciones proteína-proteína de los reguladores de respuesta (9).

Así, la unión del aspartato al quimiorreceptor Tar provoca un cambio conformacional, el movimiento de pistón, que es detectado por Che A la cual disminuye su autofosforilación y no hay transferencia de fosfato hacia Che Y ni hacia los otros aceptores de fosfato, permitiendo que los flagelos roten en el sentido contrario a las manecillas del reloj y la bacteria navegue suavemente. Aunque el movimiento de pistón es central en el señalamiento, las mutaciones en los dominios de interacción entre las subunidades del receptor que afectan la estructura y el movimiento intersubunidades, como se dijo, indican claramente la importancia de estos movimientos e interacciones.

SISTEMAS DE DOS COMPONENTES EN PLANTAS

En plantas se han identificado hasta cinco receptores de etileno que tienen alta homología con los sistemas de dos componentes, éstos han sido nombrados ERS2, ERS, ETR2, ETR1, EIN4; otro receptor de este tipo está involucrado en la vía de transducción de las citocininas, llamado CKI1, y uno más en la de los cambios de osmolaridad causados por deshidratación, salinidad y estrés por frío, llamado ATHK1. El fitocromo de *Arabidopsis*, una planta superior, tiene similitud con un sistema de dos componentes pero recientemente se ha demostrado que tiene actividad de serin-treonin-cinasa; el de *Synechocystis*, una cianobacteria, sí se fosforila sobre histidina.

Mutaciones puntuales que confieren insensibilidad al etileno en ETR1, ETR2 y EIN4 están localizadas

en el dominio transmembranal; una mutación de este tipo en cualquiera de los cinco genes produce plantas insensibles al etileno.

ETR1 tiene un dominio sensor con tres segmentos transmembranales en forma de α -hélices en donde se encuentra coordinado un cobre, y es donde une al etileno un dominio que es el que tiene la actividad de histidin-cinasa y otro que sería el regulador de respuesta; este receptor interactúa con CTR1, una cinasa parecida a Raf que regula negativamente la respuesta a esta hormona.

Los mutantes ETR1-3 tienen muy poca sensibilidad al etileno y el receptor es capaz de unir una pequeña cantidad de etileno; las ETR1-2 unen más etileno que el tipo silvestre pero parece incapaz de transmitir la señal flujo abajo, que podría ser a través de cambios conformacionales e interacciones proteína-proteína.

En algunos casos los mutantes son insensibles a dosis crecientes de receptor tipo silvestre, lo que indicaría la formación de homodímeros entre los mutantes, pero en otros casos al aumentar la dosis del gen silvestre se reduce la insensibilidad, lo que podría explicarse por la formación de heterodímeros entre receptores mutantes y silvestres, o por la formación de cúmulos de proteínas participando en la transducción de señales, o bien porque los receptores mutantes y silvestres compitan entre ellos por efectores de la vía que se hallan flujo abajo.

En plantas se han encontrado reguladores de respuesta; IBC6 e IBC7 fueron clonados de plántulas etioladas y la expresión de estos genes es inducible sólo por citocininas; la familia de genes AAR codifica para reguladores de respuesta en *Arabidopsis*; se ha comprobado que son capaces de fosforilarse y por lo tanto se postula que estén presentes en las vías de transducción donde participan las histidin cinasas (10,11,12,13).

Los sistemas de dos componentes parecen combinar la sencillez y la complejidad y son un buen ejemplo de cómo la naturaleza resuelve las necesidades de los organismos para adaptarse a su medio.

Dado que los sistemas de dos componentes están presentes sólo en bacterias, hongos y plantas se ha propuesto que podrían ser un blanco específico para antibióticos, fungicidas y herbicidas (14).

REFERENCIAS

1. Chang C y Stewart R C (1998) The two – component system. *Plant Physiol* 117: 723-731.
2. Stock J B, Stock A M y Mottonen J M (1990) Signal transduction in bacteria. *Nature* 344: 395-400.
3. Gerstein M y Chothia C (1999) Proteins in motion. *Science* 285: 1682-1683.
4. Shapiro L y Losick R (1997) Protein localization and cell fate in bacteria. *Science* 276: 712-713.
5. Gardina PJ y Manson MD (1996) Atractant signaling by an aspartate chemo receptor dimer with a single cytoplasmic domain. *Science* 274: 425-426.
6. Tatsuno I, Homma M, Oosowa K y Kawagishi I (1996) Signaling by *E. coli* aspartate chemoreceptor Tar with a single cytoplasmic domain per dimer. *Science* 274: 423-425.
7. Ymemura T, Tatsuno I, Shibasaki M, Homma M y Kawagishi I (1998) Intersubunit interaction between transmembrane helices of the bacterial aspartate chemoreceptor homodimer. *J Biol Chem* 273: 3011-3151.
8. Ottemann K M, Xiao W, Shin Y K y Koshland D E Jr (1999) A piston model for transmembrane signaling of the Aspartate receptor. *Science* 285: 1751-1754.
9. Mc Evoy M M, Hausrath A C, Randolph G B, Remington S J y Dahlquist F W (1998) Two Binding modes reveal flexibility in kinase/response regulator interactions in the bacterial chemotaxis pathway. *Proc Natl Acad Sci* 95: 7333-7338.
10. Clark K L, Larsen P B, X-Wang y Chang C (1998) Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci* 95: 5401-5406.
11. Hall A E, Chen Q G, Findell J L, Schaller G E y Bleecker A B (1999) The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor. *Plant Physiol* 121: 291-299.
12. Imamura A, Hanaki N, Umeda H, Nakamura A, Suzuki T, Ueguchi Ch y Mizuno T (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* 95: 2691-2696.
13. Urao T, Bakhtiyor Y, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, To Hirayama y Shinozak K (1999) A transmembrane Hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11: 1743-1753.
14. Bilwes A M, Alex L A, Crane B R y Simon M I (1999) Structure of Che A, a signal-transducing Histidine kinase. *Cell* 96: 131-141.

EL ENDOTELIO VASCULAR Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Nayade Pereira Roche. Grupo de Comunicación celular, Centro de Investigaciones Biomédicas "Victoria de Girón". Calle 146 y 31 Playa 11600, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono: 537-219511. Fax: 537- 337853. e-mail: jcarlos@ infomed.sld.cu

Recibido: 8 de marzo de 2000. Aceptado: 14 de noviembre de 2000.

RESUMEN

El endotelio vascular juega un papel importante en la regulación de la homeostasis vascular. Es considerado el principal regulador del tono vascular a través de la liberación de sustancias vasoactivas que controlan la relajación y la contracción vascular. La generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) contribuye al daño de la célula endotelial durante la inflamación y el proceso de isquemia/reperfusión donde es el principal blanco de la acción de las ERO. Los trastornos en la regulación del tono vascular conducen a la disfunción endotelial que se asocia con enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión arterial, la insuficiencia cardiaca, la diabetes mellitus, entre otras. Debido a esto, el endotelio vascular es considerado un blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

PALABRAS CLAVE: endotelio vascular, disfunción endotelial, aterosclerosis, isquemia/reperfusión.

ABSTRACT

The vascular endothelium plays an important role in regulating vascular homeostasis. It is a major regulator of vascular tone releasing vasoactive substances which control vascular relaxation and contraction. The high production of Reactive Oxygen Species (ROS) contributes to endothelial cell damage during the inflammatory process. The endothelial cell is the main target of ischemia/reperfusion injury. Abnormalities of endothelial regulation of vascular tone lead to endothelial dysfunction characterized by problems in the synthesis or release of relaxing or contracting factors. These latter are associated with cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension, heart failure and diabetes mellitus. Thus the endothelium could represent a novel therapeutic target for the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease.

KEY WORDS: vascular endothelium, endothelial dysfunction, atherosclerosis, ischemia / reperfusion.

ENDOTELIO VASCULAR

El endotelio vascular es la primera capa celular de los vasos sanguíneos; está en contacto directo con la sangre y el oxígeno, se orienta en el sentido del flujo sanguíneo a lo largo de todo el lecho vascular, desde el corazón hasta los más pequeños capilares. Las células endoteliales poseen alta capacidad proliferativa, se adaptan en número y disposición según los requerimientos locales y de ser necesario pueden formar nuevos capilares. El endotelio sintetiza y libera sustancias de acción autocrina y paracrina que controlan la relajación y contracción vascular, así como los procesos de trombogénesis, fibrinólisis así como la activación e inhibición plaquetaria. Bajo condiciones fisiológicas, el endotelio es un protector vascular ya que previene la adhesión de células sanguíneas y la dilatación vascular e inhibe la proliferación de células musculares lisas. Por lo tanto el mantenimiento de la integridad funcional del endotelio es un factor crítico en la preservación del flujo sanguíneo y en la prevención de la trombosis. La prostaciclina (PGI₂), el óxido nítrico (NO) y la endotelina-1 (ET-1) son sustancias primarias que dependen del endotelio (Tabla 1). Además, la célula endotelial bajo circunstancias de daño libera factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento semejante a la insulina (1).

FUNCIONES DEL ENDOTELIO VASCULAR (EV)

Actuar como barrera macromolecular: Las células endoteliales, íntimamente conectadas entre sí, constituyen una barrera con permeabilidad selectiva y con transporte activo recíproco que permite el paso de nutrientes de la luz del capilar hacia el subendotelio y metabolitos en dirección contraria (1).

Proporcionar una superficie tromborresistente:

El EV regula además la adhesión y agregación plaquetaria con la participación de la prostaciclina y el NO. Adicionalmente estimula el sistema anticoagulante y modula el sistema fibrinolítico a través de la síntesis y liberación de proteínas fibrinolíticas dentro de las que se destacan la urocinasa (UC), el activador tisular del plasminógeno, los inhibidores del activador del plasminógeno tipos 1 y 2, y el receptor de la UC (2).

Regular la función del músculo liso vascular:

La función del músculo liso vascular se regula a través de la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas constrictoras como las endotelinas y el sistema renina-angiotensina, y dilatadoras como el NO, la prostaciclina, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio y la bradicinina (1).

EL ENDOTELIO VASCULAR EN EL PROCESO INFLAMATORIO

El endotelio juega un importante papel en los procesos inflamatorios. En esas condiciones aumenta la producción de NO y prostanooides vasodilatadores por la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la Cicloxigenasa 2 (COX-2), en respuesta a la acción de citocinas proinflamatorias (4). El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) y la Interleucina 1 (IL-1) son *in vivo*, mediadores de la inflamación sistémica y de la respuesta inmune ya que actúan sobre el endotelio vascular donde potencian la expresión de moléculas de adhesión y citocinas. El TNF α se une a su receptor TNFR1 activando una cascada de señales mediada por proteínas cinasas que culmina con la translocación del factor de transcripción

TABLA I

PRINCIPALES SUSTANCIAS PRODUCIDAS POR EL ENDOTELIO VASCULAR Y SUS FUNCIONES

MEDIADOR	FUNCION EN EL ENDOTELIO
Prostaciclina (PGI ₂) Constituye la sustancia más importante derivada del ácido araquidónico en el tejido vascular (3).	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatador. • Regulador de la adhesión y agregación plaquetaria. • Inhibidor de la movilización de sitios de fibrinógeno en las plaquetas humanas, <i>in vivo</i>. • Aumenta la actividad fibrinolítica.
Óxido Nítrico (NO) Su presencia en la célula endotelial se identificó en la segunda mitad de la década del 80. Anteriormente era conocido como Factor Relajante Derivado del Endotelio (1, 3).	<ul style="list-style-type: none"> • Disminuye el tono vascular. • Potente vasodilatador. • Inhibidor de la adhesión y la agregación plaquetaria. • Inhibidor de la migración y adhesión de monocitos y leucocitos. • Disminuye la permeabilidad endotelial. • Regula el flujo de lipoproteínas al interior de la pared vascular. • Inhibe la proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares.
Endotelina (ET-1), péptido de 21 aminoácidos que no se expresa constitutivamente.	<ul style="list-style-type: none"> • La sustancia vasoconstrictora más potente que existe. • Induce la proliferación del músculo liso vascular en la subíntima.

nuclear NF- κ B del citoplasma al núcleo. De esta forma se estimula la transcripción de las moléculas de adhesión tales como, la selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 y las citocinas IL-6 e IL-8. La Selectina-E media la interacción inicial de leucocitos con el endotelio, la IL-8 activa la adhesión de aquéllos, que se unen a ICAM-1 y a otros ligandos en la superficie del endotelio. La expresión coordinada de estas moléculas produce una fuerte adhesión leucocitaria seguida de migración de estas células hacia los espacios tisulares (5). Los leucocitos y las células endoteliales activados liberan gran cantidad de las ERO mediadores del daño celular. El NO producido en grandes cantidades inhibe la respiración mitocondrial y daña al ADN mediante la formación de peroxinitrito (4). En el endotelio, las ERO producen activación de la p38, proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) con la posterior activación de la proteína cinasa 2/3 y la fosforilación de la proteína de shock térmico 27 (HSP27), modulador de la respuesta intracelular del citoesqueleto al estrés oxidativo (6).

El nivel de las ERO aumenta significativamente en el proceso de Isquemia/Reperusión. En el daño tisular que se produce en el proceso de isquemia y reperusión, se involucra la acción de la enzima xantina oxidasa con la generación del radical superóxido, vía metabólica de estrecha relación con el daño endotelial pues se ha comprobado que es la fuente principal de radicales libres en este tejido. Otro evento de importancia en la reperusión es el influjo de neutrófilos, que son secuestrados rápidamente en los pequeños vasos del órgano post-isquémico mediante la expresión de moléculas de adhesión tanto en la célula endotelial como en los leucocitos. Estos últimos también contribuyen al daño mediante la liberación de oxidantes, enzimas como las proteasas y la elastasa, por la activación de fosfolipasas y la liberación del factor activador de plaquetas (PAF) y de los leucotrienos (7). Una fuente importante de oxidantes es la reacción de Fenton con la participación del hierro liberado debido a la lisis de los eritrocitos y de las células parenquimatosas necróticas.

Como se señaló en párrafos anteriores, la localización del endotelio en contacto directo con el flujo sanguíneo lo hace un blanco potencial de los oxidantes producidos tanto por la propia célula endotelial como por los leucocitos polimorfonucleares que se acumulan durante el proceso inflamatorio. Aun en condicio-

nes basales la célula endotelial produce y libera cantidades significativas de H_2O_2 , cuyos niveles aumentan durante situaciones patológicas y de esta manera contribuye al daño de la célula por su acción intrínseca sobre estructuras celulares y por la generación del radical hidroxilo después de su transformación en presencia de metales de transición (8). El estrés oxidativo ocasiona la pérdida de la capacidad de síntesis de prostaciclina, sustancia vasodilatadora, inhibidora de la agregación y adherencia plaquetarias, agente citoprotector regulador de la actividad de la hidrolasa de ésteres de colesterol e inhibidor de la proliferación de la célula muscular lisa.

Después del proceso infeccioso-inflamatorio se produce una disfunción endotelial transitoria con desbalance en la producción de sustancias vasopresoras/vasodilatadoras que puede ocasionar vasoespasmos y trombosis (4).

DISFUNCION ENDOTELIAL

El endotelio es el principal regulador del tono vascular a través del balance entre la liberación de factores dilatadores como el NO, la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio, y factores constrictores entre los que se encuentran la endotelina-1, metabolitos de las cicloxigenasas como el tromboxano A_2 y la prostaglandina H_2 , endoperóxidos y el radical superóxido. La disminución aparente en los mecanismos de relajación dependiente del endotelio conduce a la disfunción endotelial provocada por la activación o daño de la célula endotelial. La disfunción endotelial se acompaña de vasoespasmo, trombosis y aterosclerosis. El funcionamiento del endotelio se modifica en procesos como la Diabetes Mellitus, y alteraciones cardiovasculares y cerebrovasculares. Las anomalías en la regulación del tono vascular contribuyen a un número importante de síndromes clínicos como la aterosclerosis, la hipertensión arterial, el shock séptico, entre otros. La disfunción del endotelio vascular participa, de manera importante, en la génesis y el mantenimiento de condiciones cardiovasculares patológicas (3, 7, 9, 10) como las que se observan en la Fig. 1.

El mecanismo fisiopatológico común en el desarrollo de numerosas e importantes enfermedades vasculares puede deberse a la generación de radicales libres del oxígeno, así como a la activación de vías transcripcionales sensibles a oxidantes. En situacio-

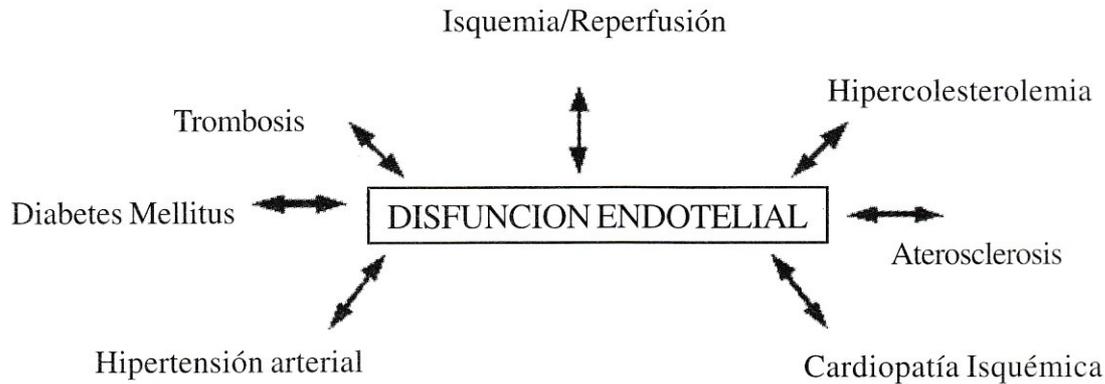


Figura 1. Relación entre la disfunción endotelial y los principales trastornos vasculares.

nes de estrés oxidativo aumentado (hipercolesterolemia, tabaquismo, altas concentraciones de angiotensina II o cuadros de infección e inflamación agudas o crónicas) se activan una amplia variedad de genes que responden a condiciones oxidativas e inducen la síntesis de factores de crecimiento, citocinas y moléculas de adhesión, las que tienen en común el hecho de aumentar la interacción entre las células endoteliales y los leucocitos. Además, estimulan el crecimiento de las células musculares lisas vasculares y participan en procesos relacionados con la inflamación vascular y su remodelación (11). Las ERO también activan factores involucrados en la respuesta inflamatoria temprana como c-fos y c-jun.

Las ERO y las Especies Reactivas del Nitrógeno participan de manera especial en la génesis y propagación del daño endotelial. La interacción entre el NO y el radical superóxido (O_2^-) es muy rápida y da lugar a la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$), un poderoso agente pro-oxidante. Bajo condiciones fisiológicas, el peroxinitrito alcanza muy bajas concentraciones y posee efectos similares a los del NO, es decir, vasodilatación e inhibición tanto de la agregación plaquetaria como de la adhesión de leucocitos a la pared vascular. Sin embargo, en condiciones patológicas aumenta y se torna tóxico para la célula endotelial, a través de la formación de otras especies reactivas como el ácido peroxinitroso y el radical hidroxilo o por producir nitración de ciertos aminoácidos lo que conduce a la fragmentación de proteínas. El

$ONOO^-$ está implicado en el inicio del proceso de peroxidación lipídica y participa en la oxidación de las lipoproteínas de la pared vascular, etapa importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Estas altas concentraciones de $ONOO^-$ se pueden alcanzar mediante el incremento de la producción de O_2^- por estimulación de la actividad de las oxidasas endoteliales, como son la xantina oxidasa o NADPH oxidasa, y por el sistema de oxidación de leucocitos que infiltran la pared vascular en etapas tempranas de la aterogénesis. El aumento de la producción de NO puede ser producido por la inducción de la óxido nítrico sintetasa inducible ante la presencia de citocinas proinflamatorias (3). La interacción entre radicales libres derivados del oxígeno y el NO participan en la fisiopatología vascular de muchas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (3, 12).

Aun antes de que se presenten las alteraciones morfológicas típicas de la aterosclerosis, existe ya una alteración funcional del endotelio. Cuando se forma la placa aterosclerótica se produce la ruptura del endotelio vascular con una deficiente generación de sustancias biológicamente activas producidas por éste, como son el NO y la prostaciclina. Hay múltiples mecanismos involucrados en la patogénesis de la disfunción endotelial durante la aterosclerosis, dentro de ellos, la reducida producción de NO por el endotelio posee un papel primordial. Ésta puede ser causada por trastornos en la transducción de señales, además de la disponibilidad de L-arginina,

de cofactores de la sintasa de NO y en la expresión de esta enzima. En la aterosclerosis también parecen estar involucrados otros trastornos de los mecanismos de relajación dependiente del endotelio como son, el aumento de la destrucción del NO por el O_2^- , la respuesta alterada del músculo liso vascular y la liberación de factores vasoconstrictores (13).

Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) inhiben la relajación dependiente del endotelio y potencian la vasoconstricción inducida por sustancias agonistas a través de un efecto directo en el músculo liso vascular. Las LDLox tienen propiedades aterogénicas y citotóxicas. Se ha reportado que LDLox a bajas concentraciones son potentes inductores de apoptosis en la célula endotelial. Estos efectos citotóxicos explican, en parte, los cambios morfológicos de las células endoteliales y la pérdida de su alineamiento que se observa en la superficie de las lesiones ateroscleróticas. Estas alteraciones se asocian con un aumento de la adhesión plaquetaria, la deposición de fibrina y la formación de microtrombos; así como con los trastornos en el tono vascular, procesos que producen alteraciones vasculares locales y eventos trombóticos. Durante estos procesos aumentan los niveles de los productos de la peroxidación lipídica (14).

La alteración en la síntesis endotelial en pacientes con factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular (hipercolesterolemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus, estatus post-menopáusico, hábito de fumar e infecciones) aceleran el proceso aterosclerótico.

En todos los tipos de hipertensión arterial hay alteraciones marcadas en la relajación dependiente del endotelio debido a una producción reducida o a un bajo efecto ya sea del NO derivado del endotelio o del factor hiperpolarizante derivado del endotelio. En la hipertensión arterial esencial se reduce la relajación dependiente del endotelio debido a la producción de prostanoïdes vasoconstrictores (endoperoxidos y tromboxano A_2), donde existe además una menor producción basal de NO. La disfunción endotelial en los vasos sanguíneos hipertensivos es una consecuencia más que una causa del síndrome (12).

El control de los factores que conducen al estrés oxidativo y la administración de agentes protectores del endotelio vascular pueden reducir el riesgo de padecimiento de enfermedades cardiovasculares. Se considera que las Vitaminas E, C y A, y la Coenzima Q_{10} son antioxidantes y tienen efecto como protectores endoteliales reduciendo la morbilidad y mortalidad por enfermedades coronarias. De esta forma los agentes antioxidantes limitan la progresión de las lesiones ateroscleróticas y mejoran la producción y la acción del NO. En particular la Vitamina E regula la expresión de moléculas de adhesión e inhibe la función plaquetaria, reduciendo así el daño al endotelio vascular y la incidencia de enfermedades vasculares y aterosclerosis (15).

REFERENCIAS

1. López-Jaramillo P (1998) Fisiología del endotelio vascular. En: Bioquímica del endotelio vascular: implicaciones fisiológicas y clínicas, cuarta edición. Editor: López-Jaramillo P. Ed. Lithoprint, Quito, pp 9-40.
2. Zoellner H, Hofler M, Beckmann R, Bielek E, Vanyek E, Kumabashiri I, Binder B (1995) Fibrinolytic proteins in apoptotic human umbilical vein endothelial cells. *Throm Res* 91: 209-219.
3. López-Jaramillo P (1998) Disfunción endotelial y enfermedad aterosclerótica. En: Bioquímica del endotelio vascular: implicaciones fisiológicas y clínicas, cuarta edición. Editor López-Jaramillo P. Ed. Lithoprint, Quito, pp 65-81.
4. López-Jaramillo P (1998) Infección, inflamación y disfunción endotelial. En: Bioquímica del endotelio vascular: implicaciones fisiológicas y clínicas, cuarta edición. Editor López-Jaramillo P. Ed. Lithoprint, Quito, pp 107-116.
5. Pober JS (1998) Activation and injury of endothelial cell by cytokines. *Pathol Biol Paris* 46: 159-163.
6. Hout J, Houle F, Marceau F, Landry J (1997) Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Res* 80: 383-392.
7. Conger JD, Weil JV (1995) Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J Invest Med* 43: 431-442.
8. Kondo T, Kinouchi H, Kawase M, Yoshimoto T (1996) Differential response in the release of hydrogen

- peroxide between astroglial cells and endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Lett* 215:103-106.
9. Boulanger CM (1999) Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 31: 39-49.
 10. Quyumi AA (1998) Endothelial Function in health and disease: new insights into genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 105: 32S-39S.
 11. Murui N, Offerman MK, Swelick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 92: 1866-1874.
 12. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF (1999) Endothelial Function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 34: 539-545.
 13. Shimokawa H (1999) Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 31: 23-37.
 14. Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Pieraggi MT, Arnal JF, Salvayre R, Nègre-Salvayre A (1997) Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 331-339.
 15. Anderson TLG, Matz J, Ferns GAA, Anggard EE (1994) Vitamin E reverses cholesterol-induced endothelial dysfunction in the rabbit coronary circulation. *Atherosclerosis* 111: 9-45.

LA ATP SINTETASA

Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Guadalupe Guerra. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Bioquímica Microbiana. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Apdo. Postal 4-870. CP 06400, México, D. F. Tel. 57-29-60-00. Correo electrónico: lupegs@hotmail.com.

Recibido: 5 de octubre de 1999. Aceptado: 12 de diciembre de 2000.

RESUMEN

La síntesis del ATP es uno de los objetivos finales de la degradación de los nutrimentos en los seres vivos. Es la forma de obtener energía de los alimentos a través de la formación de una molécula que se utilizará para realizar trabajo en las células. Con la obtención de la estructura cristalográfica del sector F_1 de la ATP sintetasa y la propuesta de un modelo estructural para la región F_0 se ha dado un gran paso en el conocimiento del mecanismo por medio del cual la ATP sintetasa acopla la síntesis de ATP a la disipación del gradiente electroquímico de protones. En este manuscrito se revisarán dichos avances.

PALABRAS CLAVE: Síntesis de ATP, estructura de la ATP sintetasa.

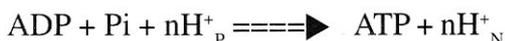
ABSTRACT

ATP synthesis is one of the final fates of the nutrients degradation in the living cells. It is the way that cells deal with the conservation of energy from nutrients to do several types of work, among other functions. With the resolution of the 3D structure of the F_1 domain of the ATP synthase and the proposal of a model for the F_0 sector, a novel mechanism has been proposed to explain the coupling between ATP synthesis and the dissipation of the proton electrochemical gradient. In this manuscript we review this novel mechanism.

KEY WORDS: ATP synthesis, structure of ATP synthase.

INTRODUCCIÓN

La ATP sintetasa cataliza, en condiciones fisiológicas, la síntesis de ATP en un proceso que se acopla a la disipación del gradiente electroquímico de protones. La reacción se describe a continuación:



en donde n corresponde al número de protones que fluyen a través de la membrana por cada molécula de ATP

que se sintetiza, y los subíndices P y N indican el lado positivo y negativo de la membrana, respectivamente.

Todas las ATP sintetatas están formadas por dos porciones, una soluble (F_1) y otra membranal (F_0). En el caso de la sintetasa de *Escherichia coli*, la porción F_1 está constituida por las subunidades α (55 kDa), β (50 kDa), γ (31 kDa) δ (19 kDa) y ϵ (14 kDa), con una estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (Fig. 1). Independientemente del origen de la sintetasa, el hexámero $\alpha_3\beta_3$ se organiza en una región globular con una región central relativamente hueca ocupada principalmente por la subunidad γ (1). La porción F_0 en *E. coli* está formada por las subunidades **a** (30 kDa), **b** (17 kDa) y **c** (8 kDa) con una estequiometría ab_2c_{12} (Fig. 1) (2,3). La subunidad **a** tiene cinco hélices transmembranales (2,4), la subunidad **b** un segmento transmembranal, y la subunidad **c** dos (2). Las 12 copias de la subunidad **c** forman un disco o anillo dentro del cual se insertan las subunidades γ y ϵ de la F_1 , de tal manera que semejan el eje de un motor (5, 6). Por fuera del anillo de las subunidades **c** se encuentran la subunidad **a** y el dímero de las subunidades **b** (7). A su vez, este dímero interactúa con una de las subunidades α de la porción F_1 a través de la subunidad δ (Fig. 1). Por tanto, la ATP sintetasa tiene dos cuellos que conectan a la región F_0 con la F_1 , uno central, formado por las subunidades γ y ϵ , y otro periférico, formado por el dímero de las subunidades **b** (Fig. 1) (7). En las mitocondrias de los mamíferos, la porción F_0 tiene 9 subunidades (**a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**, **g**, **F₀** y **A6L**). La subunidad que confiere sensibilidad a la oligomicina (OSCP) corresponde a la subunidad δ de la enzima de *E. coli*. Además, hay otras subunidades adicionales en la ATP sintetasa mitocondrial, como la proteína inhibidora (3, 8). Cabe mencionar que a pesar de que la OSCP confiere sensibilidad al inhibidor, el sitio de unión de la oligomicina se encuentra probablemente en la subunidad **a**.

En la región F_1 es en donde se lleva a cabo la hidrólisis o la síntesis del ATP, mientras que en la F_0 ocurre el transporte de H^+ . Hay seis sitios de unión

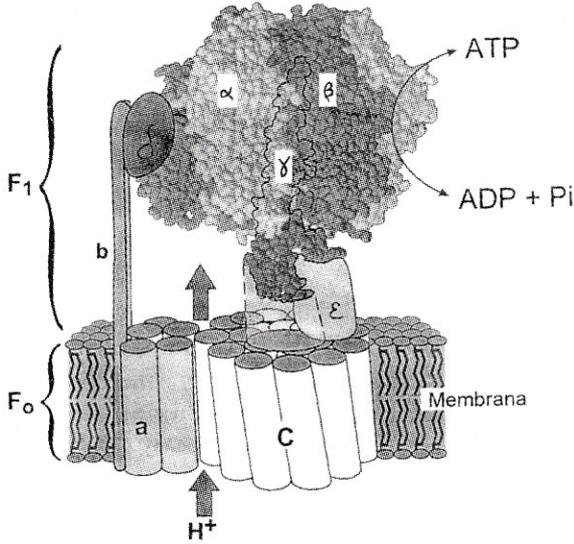


Figura 1. Estructura de la ATP sintetasa de *Escherichia coli*. La ATP sintetasa está formada por una porción membranal (F_0) y una soluble (F_1). La porción F_1 a su vez está constituida por las subunidades α , β , γ , δ y ϵ , con una estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (1). La porción F_0 en *E. coli* está formada por las subunidades **a**, **b** y **c** con una estequiometría ab_2c_{12} . Las 12 copias de la subunidad **c** forman un disco o anillo dentro del cual se insertan las subunidades γ y ϵ de la F_1 , de tal manera que semejan el eje de un motor. Por fuera del anillo de las subunidades **c** se encuentran la subunidad **a** y el dímero de las subunidades **b**. A su vez, este dímero interactúa con una de las subunidades α de la porción F_1 a través de la subunidad δ (Figura tomada de la referencia 16).

para los nucleótidos en el hexámero $\alpha_3\beta_3$, todos ellos en las interfaces entre las subunidades α y β . Los sitios catalíticos se encuentran predominantemente en las subunidades β , mientras que los no catalíticos en las subunidades α (1). El papel de estos últimos en la hidrólisis del ATP o en la regulación de la actividad de la enzima está todavía en discusión. Mientras que unos trabajos muestran que estos sitios no son importantes para la actividad de la enzima (9), otros resultados indican que la incapacidad de estos sitios no catalíticos para unir a los nucleótidos conduce finalmente a la inhibición de la hidrólisis, pero no de la síntesis de ATP (10, 11). Por otro lado, tanto la síntesis del ATP como su hidrólisis se caracterizan por presentar una cooperatividad catalítica muy importante.

MECANISMO DE SITIOS ALTERNANTES

Como se mencionó, los sitios catalíticos de la ATP sintetasa trabajan de manera cooperativa y alternan, en forma secuencial, entre tres diferentes estados conformacionales con diferentes afinidades por los nucleótidos (Fig. 2). Estos tres estados son el abierto (open, O), el laxo (loose, L) y el compacto (tight, T) (12, 13). De acuerdo con el modelo de Boyer, cuando el sitio se encuentra en la conformación O está vacío, mientras que en la forma L el sitio tiene ADP y fosfato inorgánico, y si adopta la conformación T hay una molécula de ATP fuertemente unida. La energía del gradiente de protones se utiliza para convertir al

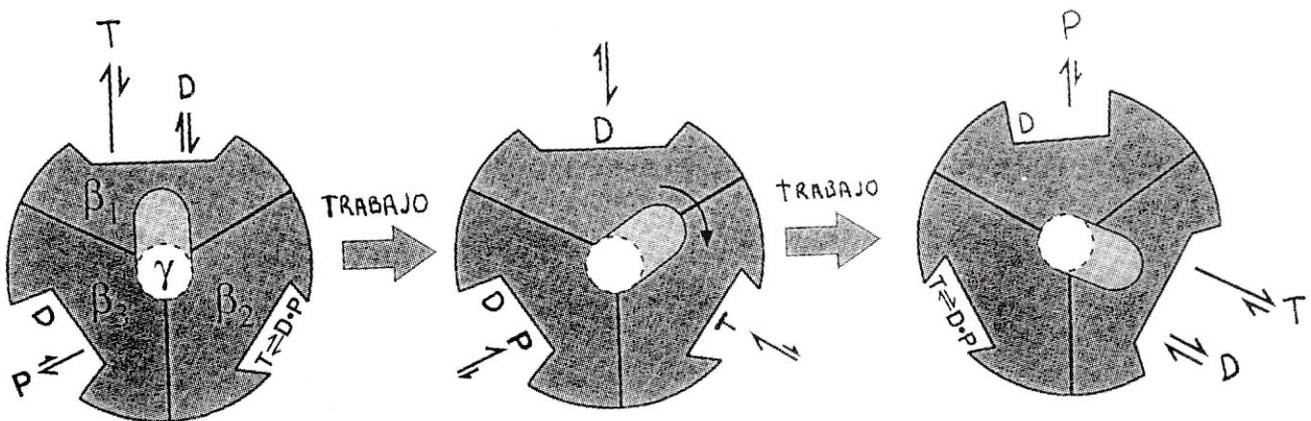


Figura 2. Mecanismo de sitios alternantes. Los tres sitios catalíticos de la ATP sintetasa alternan, en forma secuencial, entre tres diferentes estados conformacionales con diferentes afinidades por los nucleótidos. Estos tres estados son el abierto (open, O), el laxo (loose, L) y el compacto (tight, T) (Figura tomada de la referencia 16).

sitio T, con ATP fuertemente unido, en un sitio O, lo que conduce a la liberación del nucleótido. Simultáneamente, un sitio L con ADP y fosfato inorgánico se convierte en un T, lo que da lugar a la síntesis de una molécula de ATP en uno de los sitios activos de la enzima. Asimismo, un sitio O, con baja afinidad por los nucleótidos, se convierte en sitio L, listo para unir a los sustratos (Fig. 2) (12, 13). A este modelo se le conoce con el nombre de mecanismo de sitios alternantes, y se basa en la transformación secuencial de la conformación estructural de los sitios, misma que se expresa en cambios en sus afinidades por los sustratos y los productos durante el ciclo catalítico (12, 13).

LA ATP SINTETASA COMO UN MOTOR QUE GIRA

La ATP sintetasa es un transductor de energía que convierte la fuerza protomotriz de la diferencia de potencial electroquímico de protones a través de la membrana, en un torque rotatorio que se utiliza para promover la unión del fosfato a la enzima y la liberación del ATP del sitio activo (14). Funcionalmente, la ATP sintetasa puede dividirse en dos regiones: el rotor y el estator. En la enzima de *E. coli*, el rotor está formado por las subunidades $c_{12}\gamma\epsilon$, y el estator por las subunidades $ab_2\beta\alpha_3\beta_3$ (Fig. 3) (15,16, 17). El giro del rotor con respecto al estator induce la síntesis del ATP o la formación de un gradiente de protones (esto último, en el caso en que se lleve a cabo la reacción opuesta, la hidrólisis de ATP). De hecho, puede considerarse que la ATP sintetasa está formada por dos máquinas rotatorias, los motores F_0 y F_1 (15-17). El motor F_0 convierte la energía del gradiente electroquímico de protones en un torque rotatorio sobre la subunidad γ , la cual gira en el sentido contrario a las manecillas del reloj, cuando se mira a la ATP sintetasa desde la F_1 . Por otro lado, durante la hidrólisis del ATP, el motor F_1 mueve a la subunidad γ en el otro sentido. Con este modelo, se propone que cuando el gradiente electroquímico de H^+ es grande y la concentración de ATP baja, predomina el motor F_0 , la subunidad γ gira en el sentido contrario de las manecillas del reloj y obliga a la F_1 a sintetizar ATP. En el otro extremo, cuando la concentración de ATP es grande y el gradiente de protones pequeño, el motor de la F_1 predomina y la subunidad γ , junto con el anillo de subunidades c (F_0) gira en el sentido de las manecillas del reloj y se bombean protones en contra del gradiente electroquímico (15, 16,17).

EL CAMINO DE LOS PROTONES

Ante estas evidencias surge la siguiente pregunta: ¿cuál es la trayectoria que siguen los protones en la enzima para viajar de un lado de la membrana al otro? Para contestar se debe aclarar que no existe un canal clásico como tal, con un poro central que atravesase la membrana y por donde fluyan los protones. En su lugar, se piensa que hay dos “semicanales” y un mecanismo rotatorio que lleva a los protones de un “semicanal” al otro, a través de la protonación de un residuo de ácido aspártico en el caso de *E. coli* o de un residuo de ácido glutámico en la ATP sintetasa de las mitocondrias (15, 16, 17).

En la porción F_0 de la sintetasa de *E. coli* hay un anillo de 12 subunidades c que forman parte de la maquinaria del transporte de protones (5, 6). Por fuera de este anillo se encuentra la subunidad a , que contiene cinco cruces transmembranales y un residuo de arginina justo a la mitad de la membrana (4, 15-17). Además, cada una de las subunidades c tiene dos cruces transmembranales y un residuo de ácido aspártico a la mitad de la región transmembranal, en contacto con la fase hidrofóbica de la membrana.

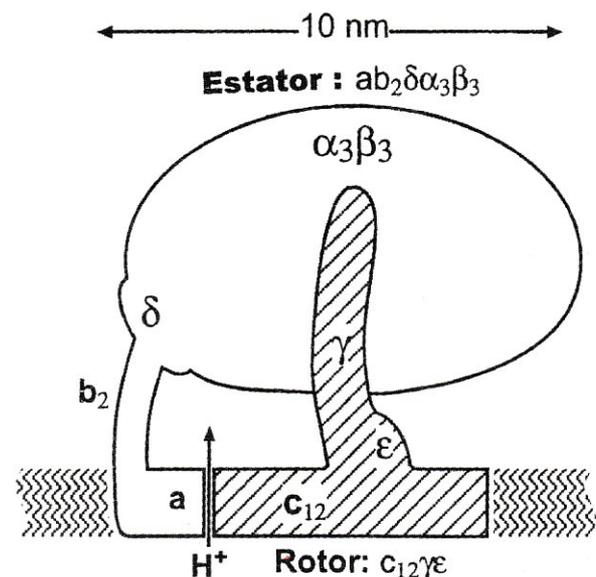


Figura 3. Modelo de estator y rotor de la ATP sintetasa. En analogía con un motor eléctrico, se considera que el rotor de la ATP sintetasa está formado por las subunidades $c_{12}\gamma\epsilon$, mientras que el estator por las subunidades $ab_2\alpha_3\beta_3$. El giro del rotor con respecto al estator conduce al acoplamiento de la síntesis (o hidrólisis) de ATP con la translocación de protones a través de la membrana (Figura tomada de la referencia 14).

Esta disposición de grupos cargados impone ciertas restricciones electrostáticas. Por un lado, el grupo carboxilo que mira a la membrana debe estar protonado, ya que la introducción de una carga en un ambiente hidrofóbico es muy costoso desde un punto de vista energético. Sin embargo, la arginina de la subunidad **a**, en contacto con el anillo de subunidades **c**, estabiliza la forma desprotonada del carboxilo que está en su cercanía. Con esta información se puede construir el modelo de la Fig. 4, que describe el flujo de H^+ a través de la porción F_0 (15, 16, 17). Un protón entra por el “semicanal” de la parte inferior y se une al carboxilato de la subunidad **c**, con lo cual se neutraliza su carga y pasa a la fase hidrofóbica. Al mismo tiempo otro protón, diferente a éste, sale por el otro “semicanal”. La entrada de otros protones por el “semicanal” inferior induce la rotación del anillo de subunidades **c**, en el sentido contrario al giro de las manecillas del reloj, hasta que el carboxilo que se protonó por primera vez da toda la vuelta y tiene acceso al “semicanal” superior que mira al otro lado de la membrana (15,16,17). En este momento se suelta el protón que viaja por el “semicanal” superior hacia el medio acuoso y el carboxilato se estabiliza por la carga positiva de la arginina de la subunidad **a**. Por tanto, el

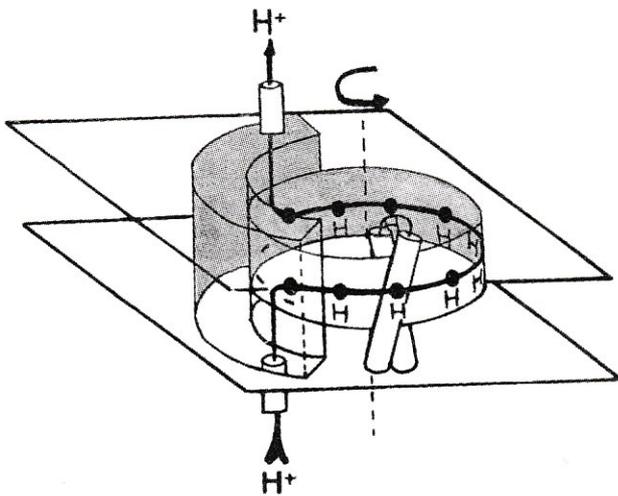


Figura 4. Transporte de H^+ a través de la membrana por la porción F_0 . Las 12 copias de la subunidad **c** forman un disco o anillo, por fuera del cual se encuentran la subunidad **a** y el dímero de las subunidades **b**. Cada una de las subunidades **c** de *E. coli* tiene un residuo de ácido aspártico a la mitad de la región transmembranal. Se ha propuesto que durante la síntesis de ATP un protón entra por el semicanal inferior, protona al residuo de aspartato de la subunidad **c**, el anillo de subunidades **c** gira 30° y un protón que proviene de un residuo de aspartato de otra subunidad **c** se libera hacia el citosol (o matriz mitocondrial) a través del otro semicanal (Figura tomada de la referencia 15).

protón que entra por el “semicanal” de un lado de la membrana tiene que dar toda la vuelta sobre la región hidrofóbica de la membrana para salir por el otro “semicanal”. Asimismo, la dirección del giro del anillo de subunidades **c** depende de la diferencia de potencial electroquímico de protones. Si el potencial electroquímico de los protones es mayor en el lado inferior, los protones entrarán por el “semicanal” inferior, harán girar el anillo en el sentido contrario a las manecillas del reloj, y saldrán al compartimiento superior, con un potencial electroquímico menor (15, 16, 17).

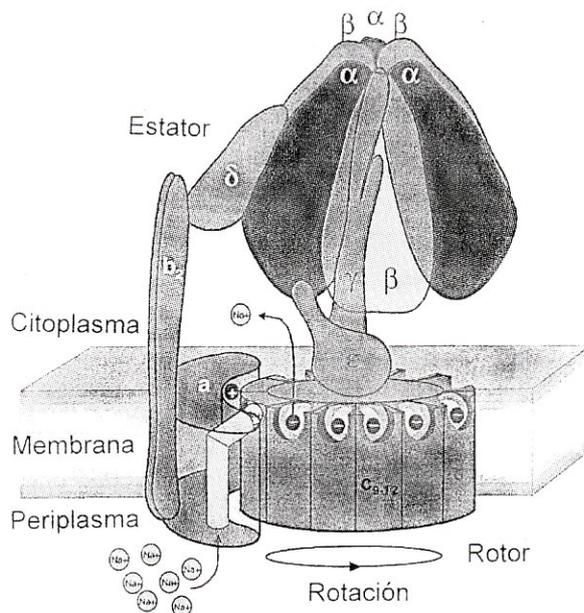
Un modelo alternativo: la ATP sintetasa de *Propionigenium modestum*

La ATP sintetasa de *P. modestum*, otro miembro de la familia de ATP sintetasas del tipo F_1F_0 , transporta Na^+ en vez de H^+ (18). A pesar de esta diferencia de especificidad, la estructura general de la enzima de *P. modestum* es idéntica a la ATP sintetasa de las mitocondrias o de *E. coli* (Fig. 5). La dicitclohexilcarbodiimida (DCCD), un inhibidor clásico de estas enzimas, detiene la síntesis de ATP y el bombeo de Na^+ a través de la membrana que cataliza la ATP sintetasa de *P. modestum*, pero no afecta el intercambio isotópico $^{22}Na^+$ fuera / $^{22}Na^+$ dentro (18), lo cual indica que el rotor, formado por el anillo de subunidades **c**, no tiene que dar una vuelta completa para transportar un ión Na^+ a través de la membrana (18). Este resultado condujo a la propuesta de un nuevo modelo de la ATP sintetasa, con un solo semicanal para la conducción del Na^+ o del H^+ (Fig. 5) (18). De acuerdo con este modelo, los sitios de liberación del Na^+ (o H^+) fuera de la interfase rotor-estator están en contacto directo con el citoplasma (Fig. 5). El transporte neto de Na^+ (o H^+) a través de la membrana ocurre cuando el rotor da un giro completo. En presencia de una diferencia de potencial electroquímico de Na^+ a ambos lados de la membrana, el Na^+ entra por el semicanal que está en contacto con el periplasma, se deposita en los sitios de liberación y pasa al citoplasma (18). Acoplado a este giro completo del anillo de subunidades **c** se lleva a cabo la síntesis de ATP en la porción F_1 . La modificación de una de las subunidades **c** con el DCCD inhibe la rotación completa del anillo de subunidades **c**, pero no la semirrotación del anillo. En consecuencia, se detiene completamente el flujo neto de sodio a través de la membrana, pero no se inhibe el intercambio $^{22}Na^+$ fuera / Na^+ dentro. Esto se debe a que el

sitio de liberación que se encuentra en contacto con el citoplasma y cerca de la subunidad **a**, acepta un ion Na^+ , lo cual permite que el anillo de subunidades **c** gire 30° en el sentido contrario de las manecillas del reloj (ver la Fig. 5); con este movimiento se permite que el Na^+ se deposite en el semicanal y se libere en el periplasma (18). Sin embargo, debido a las restricciones electrostáticas descritas en la sección anterior, para que el anillo de subunidades gire 30° en el sentido de las manecillas del reloj (Fig. 5) y regrese a su posición original, debe tomar un ión Na^+ del periplasma, lo cual resulta en un intercambio isotópico (18).

Un cambio conformacional en la subunidad **c** impulsa la rotación del anillo de subunidades **c**

Por muchos años se consideró que la síntesis de ATP en el dominio F_1 estaba relacionada con cambios



modestum. Como otros miembros de la familia, este complejo proteico está formado por dos sectores, el F_1 y el F_0 , pero transporta Na^+ en vez de H^+ . El rotor está formado por 12 subunidades **c** que forman un anillo y las subunidades ϵ y γ . Las siguientes subunidades constituyen el estator: **a**, **b**, δ , α y β . La rotación del rotor en el sentido de las manecillas del reloj se asocia con el transporte de sodio del periplasma al citoplasma. Cuando el rotor gira en sentido contrario, el flujo de sodio es del citoplasma hacia el periplasma. En el modelo se observa que el sitio de liberación del sodio en la porción F_0 se encuentra cerca del citoplasma, por lo que este modelo sólo tiene un semicanal (Figura tomada de la referencia 17).

conformacionales en la región F_0 , que se producían como consecuencia de la protonación y desprotonación del grupo carboxilo de la subunidad **c**. Sin embargo, hasta hace poco no se había podido identificar un cambio conformacional en la región membranal de la ATP sintetasa que se asociara con la síntesis del ATP. La adquisición de la estructura terciaria de la subunidad **c** (19) y el desarrollo de un modelo para el anillo de las subunidades **c** (5) cambiaron este panorama. El mecanismo que se presenta en la Fig. 6 se deriva de un trabajo reciente en el que se muestra, por medio de resonancia magnética nuclear, que la subunidad **c** en solución adopta dos conformaciones diferentes, dependiendo de su estado de protonación (20).

Como se ilustra en la Fig. 6, la protonación del residuo de aspartato 61 en la subunidad **c** induce un cambio conformacional importante en la proteína, que se describe como una rotación de la hélice carboxilo terminal con respecto a la hélice amino terminal (Fig. 6, a). Durante esta rotación, la arginina 210 de la subunidad **a** se mueve junto con la hélice carboxilo terminal de la subunidad **c** (Fig. 6, b), y adopta una nueva posición entre el siguiente par de subunidades **c** (Fig. 6, c). Finalmente, la desprotonación del aspártico 61 regresa la conformación de la subunidad **c** a su posición original (Fig. 6, d). Se ha propuesto que este ciclo de protonación-desprotonación de una subunidad **c** resulta en la translocación de un protón a través de la membrana y en 30° de rotación del anillo de subunidades **c** con respecto al elemento estático formado por las subunidades a_1b_2 en F_0 y $\delta_1\alpha_3\beta_3$ en la porción F_1 (20, 21).

La estequiometría H^+/ATP de la ATP sintetasa

El número de protones que se bombean por ATP sintetizado (o hidrolizado) dependerá del número de subunidades **c** en el anillo: si éste es un oligómero de 9 subunidades, la estequiometría será de $3\text{H}^+/\text{ATP}$, mientras que si tiene 12 subunidades, será de $4\text{H}^+/\text{ATP}$. En el sentido biosintético, un giro completo del motor F_0 se asocia con el bombeo de 9 o 12 protones hacia un lado de la membrana y con la síntesis de tres moléculas de ATP en la porción F_1 , ya que ésta contiene tres sitios catalíticos que funcionan en forma alternada. Puesto que las evidencias experimentales apoyan un anillo con 12 subunidades **c** para la F_0 (6), es muy probable que la estequiometría de $4\text{H}^+/\text{ATP}$ sea la correcta.

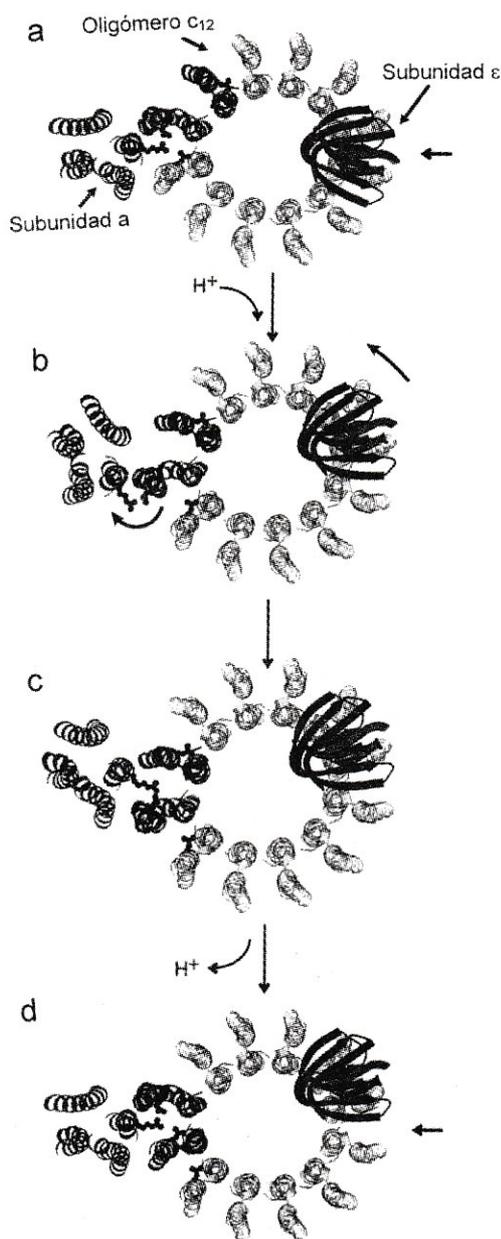


Figura 6. Rotación del anillo de subunidades **c** como consecuencia de la protonación del aspártico 61. a) Estado de reposo. La arginina 210 de la subunidad **a** se encuentra entre dos subunidades **c**, una de ellas con el aspártico 61 protonado y la otra con este residuo desprotonado. b) Con la protonación del aspártico 61 se induce un cambio conformacional en la hélice carboxilo terminal que empuja a la arginina 210 de la subunidad **a**. c) Intermediario en el cual todas las subunidades **c** se encuentran protonadas. En esta etapa la arginina 210 de la subunidad **a** se encuentra en la siguiente interfase entre dos subunidades **c**. d) Con la desprotonación del aspártico 61, el sistema adquiere una conformación semejante a la inicial, pero en este ciclo el oligómero de subunidades **c** gira 30° con respecto al elemento estático formado por las subunidades **a**, **b**₂ en **F**₀ y $\delta_1\alpha_3\beta_3$ en la porción **F**₁ (Figura tomada de la referencia 19).

Estructura del sitio activo

Como se muestra en la Fig. 7, en la unión del ATP al sitio activo participan tanto residuos de aminoácidos de las subunidades α como de la β . En el sentido de la hidrólisis del ATP, el sustrato de la enzima es el MgATP. El magnesio sirve tanto para que la unión del sustrato a la enzima sea de alta afinidad, como para que se lleve a cabo la hidrólisis del ATP (22). En ausencia de magnesio, el ATP se une a los tres sitios catalíticos con baja afinidad (100 μ M), pero no se produce la reacción de hidrólisis. Son varios los grupos que interactúan con el Mg^{2+} cuando el complejo MgATP se une al sitio activo. En la primera esfera de coordinación están los oxígenos de los fosfatos β y γ del ATP y el oxígeno del hidroxilo del residuo de la treonina 163 de la subunidad β (β -treonina163) (22). En la segunda esfera de coordinación hay tres moléculas de agua que interactúan con los oxígenos de los carboxilatos del β -aspártato 249 y del β -glutamato 192 (22). Además, el magnesio se necesita para que se alcance el estado de transición pentaco-

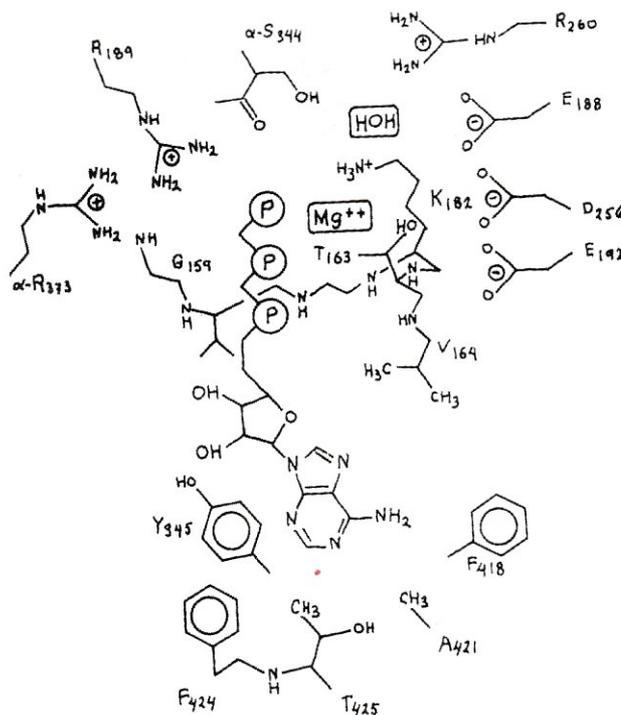


Figura 7. Estructura del sitio activo de la ATP sintetasa de mitocondrias de corazón de res. Se muestran los aminoácidos que conforman el sitio activo de la ATP sintetasa y su interacción con el ATP y el Mg^{2+}

valente bipiramidal trigonal que se ha sugerido durante la hidrólisis del MgATP (22). Hay tres residuos de aminoácidos en el sitio activo (β -lisina 162, β -arginina 189 y α -arginina 373) que estabilizan la carga negativa que se genera en dicho estado de transición (1, 22). También se observa una molécula de agua que interactúa con el carboxilato del β -glutamato 188, cerca del fosfato γ del ATP. Debido a su proximidad con el carboxilato, la reactividad de dicha molécula de agua se incrementa, por lo que es probable que sea ésta la responsable del ataque nucleofílico que se lleva a cabo sobre el fosfato γ del ATP (1, 22). La sustitución de cualquiera de estos residuos de aminoácidos por medio de mutagénesis dirigida, reduce la velocidad de hidrólisis del ATP en dos o tres órdenes de magnitud (22). Es probable que estos mismos residuos participen tanto en la unión del Mg^{2+} , el Pi y el ADP, como en la estabilización del estado de transición durante la síntesis del ATP.

Como era de esperarse, el magnesio también es importante en el sentido de la síntesis del ATP, con un papel central en la estabilización del estado de transición (23). El residuo de la alanina 158 en el asa P (GXAXXGKT) se encuentra lejos del ADP y del fosfato. Sin embargo, el Mg^{2+} favorece el cambio conformacional que produce el estado de transición, en el cual el asa P, con la alanina 158, se mueve hacia el sitio activo que contiene al MgADP y al fosfato (23). Debido a las características no polares del residuo de alanina, las moléculas de agua se desplazan fuera del sitio activo. Asimismo, con el cambio conformacional, el ADP y el fosfato se acercan y se alinean al β -glutamato 188, el cual funciona como una base catalítica en la formación del ATP. Tanto el magnesio que está en el sitio activo, como el ambiente hidrofóbico en el que se encuentran los sustratos, favorecen la salida del agua y la formación del ATP. En las siguientes etapas, la subunidad β cambia a una conformación en la cual el residuo de alanina 158 se aleja del sitio activo, lo cual resulta en la liberación de la molécula de ATP (23).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el apoyo de la UNAM a través de la DGAPA (IN200897 para JPP, IN202496 e IN200399 para FM) y del CONACyT (26096M para FM).

REFERENCIAS

1. Abrahams J, Leslie A, Lutter R y Walker J (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621-628.
2. Altendorf K, Stalz W, Greie J y Deckers-Hebestreit G (2000) Structure and function of the F_0 complex of the ATP synthase from *Escherichia coli*. *J Exp Biol* 203: 19-28.
3. Boyer PD (1997) The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Ann Rev Biochem* 66: 717-749.
4. Wada T, Long JC, Zhang D y Vik SB (1999) A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J Biol Chem* 274: 17353-17357.
5. Dimitriev OY, Jones PC y Fillingame RH (1999) Structure of the subunit c oligomer in the F_1F_0 ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7785-7790.
6. Jones PC y Fillingame RH (1998) Genetic fusions of subunit c in the F_0 sector of H^+ -transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis. *J Biol Chem* 273: 29701-29705.
7. Capaldi RA, Schulenberg B, Murray J y Aggeler R (2000) Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J Exp Biol* 203: 29-33.
8. Leslie AGW, Abrahams JP, Braing K, Lutter R, Menz IR, Orriss GL, Van Raaij ML y Walker JE (1999) The structure of bovine mitochondrial F_1 -ATPase: an example of rotary catalysis. *Biochem Soc Trans* 27: 37-42.
9. Weber J, Bowman C, Wilke-Mounts S, Senior AE (1995) alpha-Aspartate 261 is a key residue in noncatalytic sites of *Escherichia coli* F_1 -ATPase. *J Biol Chem* 270: 21045-21049.
10. Matsui T, Muneyuki E, Honda M, Allison WS, Dou C, Yoshida M (1997) Catalytic activity of the $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ complex of F_1 -ATPase without noncatalytic nucleotide binding site. *J Biol Chem* 272: 21045-21049.
11. Bald D, Amano T, Muneyuki E, Pitard B, Rigaud JL, Kruij J, Hisabori T, Yoshida M, Shibata M (1998) ATP synthesis by F_0F_1 -ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition. *J Biol Chem* 273: 21045-21049.

12. Boyer PD (1993) The binding change mechanism for ATP synthase—some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta 1140*: 215-250.
13. Boyer PD (2000) Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis. *Biochim Biophys Acta 1458*: 252-62
14. Kinosita K, Yasuda R, Noji H, Ishiwata S y Yoshida M (1998) F_1 -ATPase: a rotary motor made of a single molecule. *Cell 93*: 21-24.
15. Elston T, Wang H y Oster G (1998) Energy transduction in ATP synthase. *Nature 391*: 510-513.
16. Junge W, Lill H y Engelbrecht S (1997) ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *TIBS 22*: 420-423.
17. Oster G y Wang H (1998). ATP Synthase: Two rotary molecular motors working together. *Encyclopedia of Molecular Biology*. pp 211-215. Editor: T. E. Creighton, New York: Wiley. Energy transduction in the F_1 motor of ATP synthase. *Nature 22*: 420-423.
18. Dimroth P, Kaim G y Matthey U (2000) Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F_1F_0 ATP synthases. *J Exp Biol 203*: 51-59.
19. Girvin ME, Rastogi VK, Abildgaard F, Markley JL y Fillingame RH (1998) Solution structure of the transmembrane H^+ -transporting subunit c of the F_1F_0 ATP synthase. *Biochemistry 37*: 8817-8824.
20. Rastogi VK y Girvin ME (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature 402*: 263-268.
21. Fillingame RH, Jiang W y Dmitriev OY (2000) Coupling H^+ transport to rotary catalysis in F-type ATP synthases: structure and organization of the transmembrane rotary motor. *J Exp Biol 203*: 9-17.
22. Senior AE, Nadanaciva S y Weber J (2000) Rate acceleration of ATP hydrolysis by F_1F_0 -ATP synthase. *J Exp Biol 203*: 35-40.
23. Ko YH, Hong S y Pedersen PL (1999) Chemical mechanism of ATP synthesis. *J Biol Chem 274*: 28853-28856.

EL COMPLEJO I DE LA CADENA RESPIRATORIA Y LOS FACTORES QUE DETERMINAN LA VELOCIDAD DE LA TRANSFERENCIA DE LOS ELECTRONES

Juan Pablo Pardo, Federico Martínez, Isabel Velázquez y Oscar Flores-Herrera. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apdo. Postal 70-159, 04510. México, D.F. Teléfono: 5623-25-10. Fax: 5616-24-19; Correo electrónico: pardov@servidor.unam.mx.

Recibido: 5 de octubre de 1999. Aceptado: 12 de diciembre de 2000.

RESUMEN

Los factores que determinan la velocidad de la transferencia de electrones en una reacción de oxidoreducción son: la distancia que separa a los centros redox, el cambio de energía libre estándar de la reacción y la energía de organización de los cofactores y del medio en el que se desarrolla la reacción. Estos mismos factores son importantes en la transferencia de los electrones en la cadena respiratoria. El complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) es el primer componente de la cadena de transporte de electrones y acopla la transferencia de los electrones del NADH a una quinona con el bombeo de H^+ a través de la membrana. La estructura general del complejo I se ha conservado a lo largo de la escala filogenética, desde bacterias hasta mamíferos. El complejo I está formado por un dominio membranal y otro periférico. Cada uno de estos dominios está a su vez formado por varias subunidades. Es en el dominio membranal en donde residen las quinonas que aceptan a los electrones del NADH. La parte periférica tiene un FMN y varios centros hierro-azufre que participan en la transferencia de los electrones desde el NADH hacia el dominio membranal.

PALABRAS CLAVE: Complejo I, transporte de electrones, quinonas, centros hierro-azufre, energía de organización.

ABSTRACT

The factors determining the rate of electron transfer in a redox reaction are: the distance between the redox centers, the change in standard free energy, and the organization energy of cofactors and the surrounding media. These same factors are important to explain the rate of the electron transfer in the respiratory chain. Complex I, the first component of the electron transport

chain, couples the transfer of electrons from NADH to ubiquinone with the translocation of H^+ across the membrane. The general structure of complex I has been conserved along evolution, from bacteria to mammals. Complex I contains a membrane domain and a peripheral domain. Each one of these domains is constituted by several subunits. The membrane domain interacts with the quinone that accepts the electrons from NADH. The peripheral part has an FMN and several iron-sulfur centers that mediate the transfer of electrons from NADH towards the membrane domain.

KEY WORDS: Complex I, electron transfer, quinones, iron-sulfur centers, organization energy.

INTRODUCCIÓN

Hay tres factores que determinan la velocidad de la reacción y la dirección de la transferencia de los electrones en la respiración mitocondrial (1-3):

1. La distancia que separa a los centros redox (R) dentro de cada complejo respiratorio.
2. El cambio de energía libre estándar de la reacción de oxidoreducción (ΔG°).
3. La energía de organización de los cofactores y del medio que los rodea (λ). Como consecuencia de la transferencia de electrones durante la reacción de oxidoreducción, los cofactores sufren una redistribución de su densidad electrónica, lo que conduce a nuevos momentos dipolares. A su vez, las moléculas del medio ambiente que están en contacto con los cofactores se reagrupan para adaptarse a esta nueva situación. A la energía asociada con la reorganización de la densidad electrónica de los cofactores y con el reagrupamiento de las moléculas del microambiente que rodea a los cofactores se le llama energía de reorganización.

Estos tres factores están considerados en las siguientes fórmulas:

$$\log k_c = 13 - (0.6 \text{ \AA}^{-1})(R-3.6) - (3.1 \text{ eV}^{-1})(\Delta G^\circ + \lambda)^2/\lambda$$

para reacciones exergónicas ($\Delta G^\circ < 0$) y

$$\log k_c = 13 - (0.6 \text{ \AA}^{-1})(R-3.6) - (3.1 \text{ eV}^{-1})(-\Delta G^\circ + \lambda)^2/\lambda - \Delta G^\circ/0.06$$

para reacciones endergónicas ($\Delta G^\circ > 0$). Estas ecuaciones se utilizan para calcular la constante de velocidad (k_c) de la transferencia de un solo electrón en un complejo respiratorio (2,3). La constante de velocidad de transferencia del electrón se expresa en unidades de tiempo (s^{-1}). Para una gran cantidad de reacciones redox, el ΔG° para la transferencia de electrones entre los cofactores y en las enzimas redox tiene un valor que varía entre 0 y -0.15 eV ($1 \text{ eV} = 3.8267 \times 10^{-20} \text{ cal}$), mientras que los valores de la energía de reorganización van de 0.5 a 1.25 eV (2). Por tanto, con una separación de los centros redox de $3-10 \text{ \AA}$, se espera que la constante de velocidad tenga valores de 10^{12} a 10^7 s^{-1} (2). Si la distancia entre los cofactores se incrementa, la constante de velocidad disminuye. Asimismo, si el ΔG° de la reacción o la energía de reorganización son muy grandes, la constante de velocidad será pequeña (2,3). Esto significa que para tener una alta velocidad en la transferencia de electrones, los cofactores se deben aproximar entre 3 y 10 \AA y la reacción debe tener un ΔG° y una energía de reorganización (λ) cercanas a cero. Por otro lado, se sabe que la velocidad de una reacción depende del medio en el que se realiza, de tal manera que se obtienen velocidades diferentes si la reacción se lleva a cabo en un ambiente polar o en uno apolar. Esto se debe a que los valores de ΔG° y de λ cambian con las propiedades físicas y químicas del medio de reacción. Por tanto, el valor de la constante de velocidad va a depender, vía la alteración de ΔG° y de λ , del medio en el que se lleve a cabo la reacción.

Características generales del complejo I

La NADH:ubiquinona oxidoreductasa, también llamada NADH deshidrogenasa o complejo I, es el primer componente de la cadena respiratoria y cataliza la siguiente reacción:



en donde Q se refiere a la ubiquinona, H^+_{N} a los

protones que se tomaron del lado negativo de la membrana (matriz) y H^+_{P} a los protones que se transportaron al lado positivo de la membrana (espacio intermembranal).

El complejo I está formado por aproximadamente 43 diferentes subunidades en las mitocondrias de los mamíferos (4, 5), mientras que en *Neurospora crassa* hay 35 (6, 7) y en las bacterias 14 (8, 9). En *Escherichia coli* se produjo la fusión de dos genes, por lo que su complejo I tiene solamente 13 subunidades (8, 9). La NADH deshidrogenasa de los eucariotes tiene una masa molecular de 1000 kDa , que es aproximadamente el doble de la masa del complejo I de las bacterias (530 kDa) (4, 8, 9).

Debido a su menor complejidad y a que no se han encontrado estructuras homólogas más sencillas con las actividades de transporte de electrones y bombeo de protones, se considera que el complejo proteico bacteriano representa la organización mínima funcional del complejo I (8, 9). De las 14 subunidades que la integran, 7 son proteínas transmembranales hidrofóbicas que forman el dominio membranal del complejo, y las otras 7 se localizan en el citosol, constituyendo el dominio hidrofílico periférico (8). Este arreglo en dominios hidrofóbicos e hidrofílicos permite compartir y combinar los dos ambientes predominantes de las células, favoreciendo que las reacciones realizadas dentro de la membrana envíen los H^+ hacia el exterior de la matriz mitocondrial, con lo que se genera una diferencia de potencial electroquímico de H^+ (10). Esta disposición también favorece que el bombeo de los protones se haga en forma vectorial (10, 11).

Otras características generales del complejo I de diferentes especies son las siguientes:

1. Como grupos prostéticos tienen al mononucleótido de flavina (FMN) y varios centros hierro-azufre (5, 8, 12); en el caso del FMN, éste no se une covalentemente a la proteína y su estequiometría es de una molécula de FMN por complejo I. Por otro lado, se han observado hasta nueve centros hierro-azufre por complejo (8, 12).

2. Se inhiben con rotenona, piericidina A, amital y otros compuestos naturales y sintéticos, que tienen como característica común una estructura con una "cabeza" cíclica —que corresponde al anillo de la

ubiquinona— y una cola hidrofóbica, que corresponde a las unidades de isopreno (13).

3. Contienen de dos a tres moléculas de ubiquinona, las cuales se encuentran fuertemente unidas (10, 12).

Biogénesis del complejo I

En la construcción del complejo I de las mitocondrias intervienen tanto el genoma nuclear como el mitocondrial (5, 14). Este último codifica para las siete subunidades hidrofóbicas de la membrana (4, 5). Las subunidades codificadas por el genoma nuclear y mitocondrial se deben ensamblar para producir la forma activa del complejo I (14). La construcción del dominio membranal se lleva a cabo en forma independiente de la del dominio periférico (14). Esto se demostró cuando se incubaron a las células de *N. crassa* con cloramfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas mitocondriales y se observó que el dominio membranal del complejo I no se ensamblaba, pero sí el dominio periférico, el cual tenía la actividad de NADH deshidrogenasa en presencia de aceptores artificiales de electrones como el 2,6-diclorofenol-indofenol (14). Por tanto, las siete proteínas hidrofóbicas codificadas por el genoma mitocondrial junto con otras de origen nuclear se ensamblan para dar el dominio membranal, mientras que las subunidades restantes codificadas por el genoma nuclear se ensamblan para constituir el dominio periférico. Finalmente, ambos subcomplejos se unen para dar lugar a la enzima activa.

Desde un punto de vista evolutivo, es interesante hacer notar que las siete subunidades hidrofóbicas de la NADH deshidrogenasa, codificadas por el genoma mitocondrial, son homólogas de las siete proteínas hidrofóbicas del complejo I de *E. coli*, lo cual sugiere un ancestro común para todas ellas y apoya la hipótesis de que las mitocondrias son descendientes de células procarióticas primitivas de vida libre (15).

Aunque todavía no se ha podido cristalizar al complejo I, se han obtenido modelos de su estructura tridimensional por medio de microscopía electrónica, con una resolución de alrededor de 22 Å (4, 6, 15). La forma general de la enzima es la de una L, en la que uno de los brazos de la L tiene una localización membranal y el otro se encuentra en el citosol (en bacterias) o en la matriz mitocondrial (Fig. 1A, 1B y 1C) (4, 6, 15).

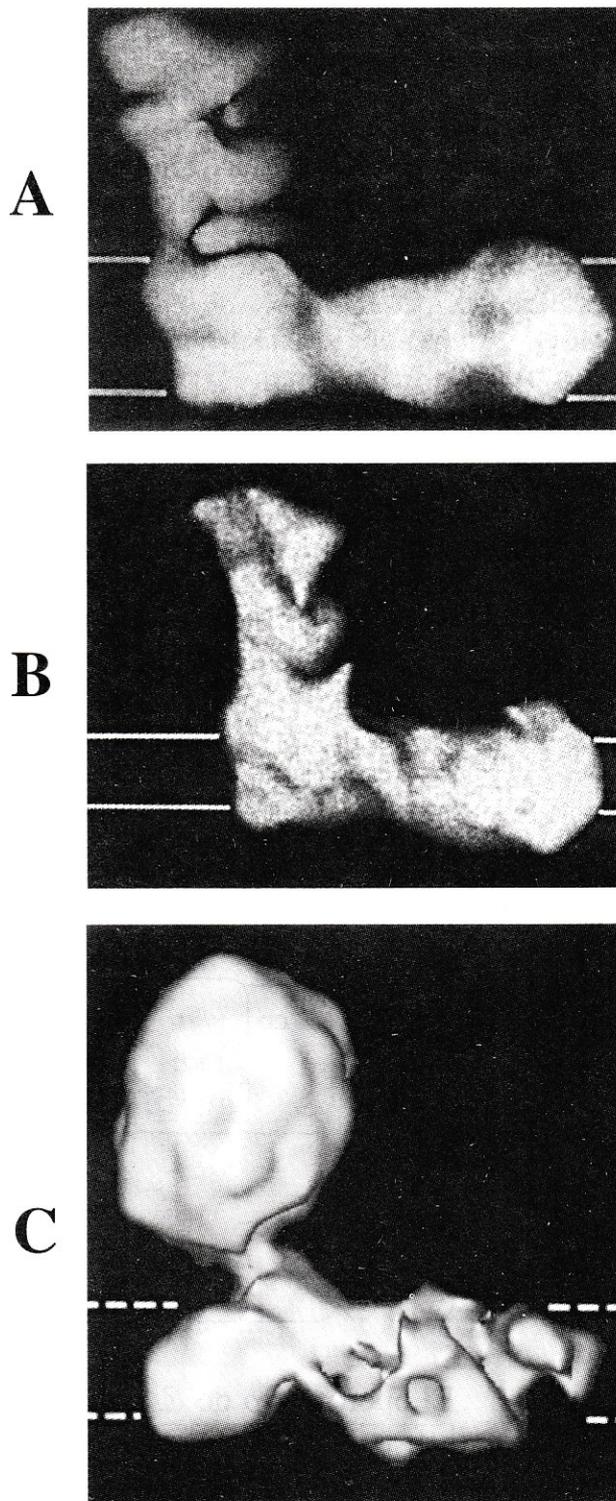


Figura 1. Modelos tridimensionales del complejo I de A) *Escherichia coli*, B) mitocondrias de *Neurospora crassa* y C) mitocondrias de mamíferos. La forma general de la enzima es la de una L, en la que uno de los brazos tiene una localización membranal y el otro se encuentra en el citosol (en bacterias) o en la matriz mitocondrial (Figuras tomadas de las referencias 15, 6 y 4, respectivamente).

El complejo I de las bacterias

Los genes del complejo I en las bacterias están organizados en el operón *nuo*, con 14 genes estructurales llamados *nuoA-N* (Fig. 2)(8). Los genes *nuoC* y *D* están separados en la mayoría de las bacterias, pero en *E. coli* se fusionaron, por lo que codifican para una sola cadena polipeptídica. El orden de los 13 ó 14 genes tiene un alto grado de conservación en las bacterias (8). Como podría esperarse, durante la transcripción se sintetiza un RNA mensajero que contiene a todos los genes *nuo*. La expresión del operón *nuo* se modula por la concentración de O₂ a través de los reguladores ArcA, NarL, FNR y otros factores (8).

La localización de los diferentes centros fierro-azufre se muestra en la Fig. 2. Se observa que el sitio de unión del NADH, el FMN y el centro fierro-azufre

N3 ([4Fe-4S]) se encuentran en la subunidad NuoF y el centro N1a ([2Fe-2S]) en la subunidad NuoE (12, 16). La subunidad NuoG contiene tres centros fierro-azufre: el N1b ([2Fe-2S]), el N4 ([4Fe-4S]) y el N5 ([4Fe-4S]) (12, 16). La localización del centro N2 no se conoce con precisión. Se ha propuesto que éste se encuentra en la subunidad NuoB o en la NuoI, muy cerca de la membrana (12, 16). Este centro tiene un papel importante en el acoplamiento de la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona y el bombeo de protones. Algunas de las propiedades más importantes del centro N2 son:

1. Contiene el centro fierro-azufre con el valor de potencial redox (E_m) más grande del complejo I.
2. La reacción de oxidorreducción se acopla con la unión o liberación de un protón, por lo que su E_m depende del pH (-60 mV/pH).

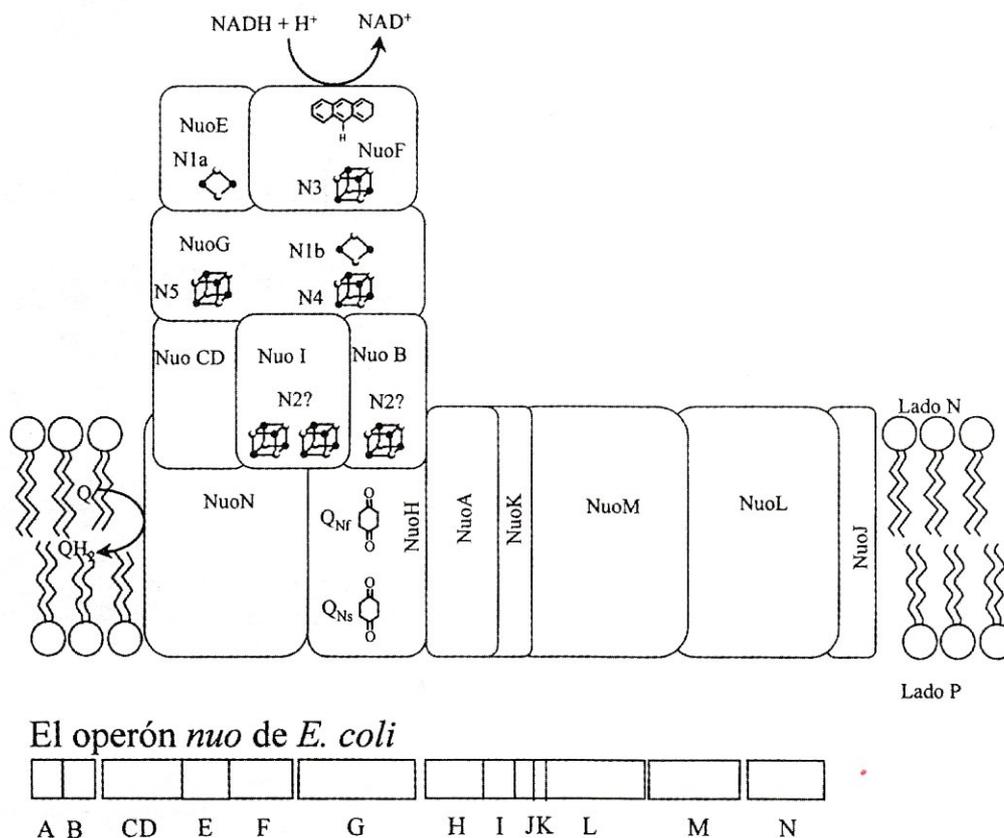


Figura 2. Componentes del complejo I de *Escherichia coli*. El complejo I de *E. coli* está formado por 13 diferentes subunidades, seis de ellas son proteínas periféricas y siete son proteínas transmembranales. El sitio de unión del NADH, el FMN y el centro fierro-azufre N3 se encuentran en la subunidad NuoF y el centro N1a en la subunidad NuoE. La subunidad NuoG contiene tres centros fierro-azufre: el N1b, el N4 y el N5. El centro N2 se localiza muy cerca de la membrana, probablemente en la subunidad NuoB o en la NuoI. N y P significan los lados negativo y positivo de la membrana, respectivamente. En la parte inferior se muestra el operón *nuo* con los genes que codifican para las subunidades del complejo I en *E. coli* (Figuras tomadas de las referencias 8 y 12).

3. Aunque no se encuentra en una subunidad transmembranal, se considera que está cerca de la membrana, ya que no se puede extraer sin detergentes.

Transporte de electrones del NADH a la quinona

Como se mencionó, el complejo I tiene una región membranal y una región globular, hidrofílica y periférica, con una longitud aproximada de 80 Å (4). Todos los grupos redox del complejo I se encuentran en la región globular, mientras que las moléculas de ubiquinona se encuentran asociadas a una o varias de las proteínas transmembranales del complejo (12, 16). Si se consigue una geometría tal que la separación entre los centros redox sea de 8 a 10 Å, entonces la velocidad de la transferencia de electrones será alta. Esta disposición óptima de los cofactores redox se muestra en la Fig. 3. Se observa que el NADH cede sus electrones al FMN, dando lugar a la forma reducida de la coenzima, el FMNH₂. Este paso se realiza a través de la transferencia de dos electrones. El FMNH₂ cede luego un solo electrón al centro hierro-azufre N3, lo que resulta en la producción de una semiflavona (SF). Debido a que ésta es relativamente estable, se facilita la transferencia de un solo electrón al primer centro hierro-azufre. Por las características

moleculares de los centros hierro-azufre del complejo I, de aquí en adelante las reacciones de oxidoreducción consisten en la transferencia de un solo electrón.

Del N3, el electrón pasa secuencialmente de los centros N1a, N1b y N4, al centro N2, que se localiza cerca de la membrana, probablemente a 8-10 Å del sitio de la quinona (Q) en el dominio membranal del complejo I. El resultado de esta secuencia de reacciones es la producción de una semiquinona (SQ). A continuación, la SF cede el electrón que le queda al centro N3, lo cual regenera al FMN oxidado (F) y se completa la transferencia de los dos electrones a la quinona, lo que resulta en la producción de la hidroquinona (QH₂). Con esta organización espacial de cofactores redox, los electrones recorren los 80 Å de la región globular en unos cuantos microsegundos, de tal manera que la transferencia de electrones del NADH a la quinona se lleva a cabo con rapidez y eficiencia. Obsérvese que para abarcar los 80 Å del dominio globular del complejo I, aun en el caso de que el FMN se encontrara en el extremo opuesto, se necesita una separación entre los grupos redox no mayor de los 9 Å, que es una distancia adecuada para facilitar el transporte de electrones (2).

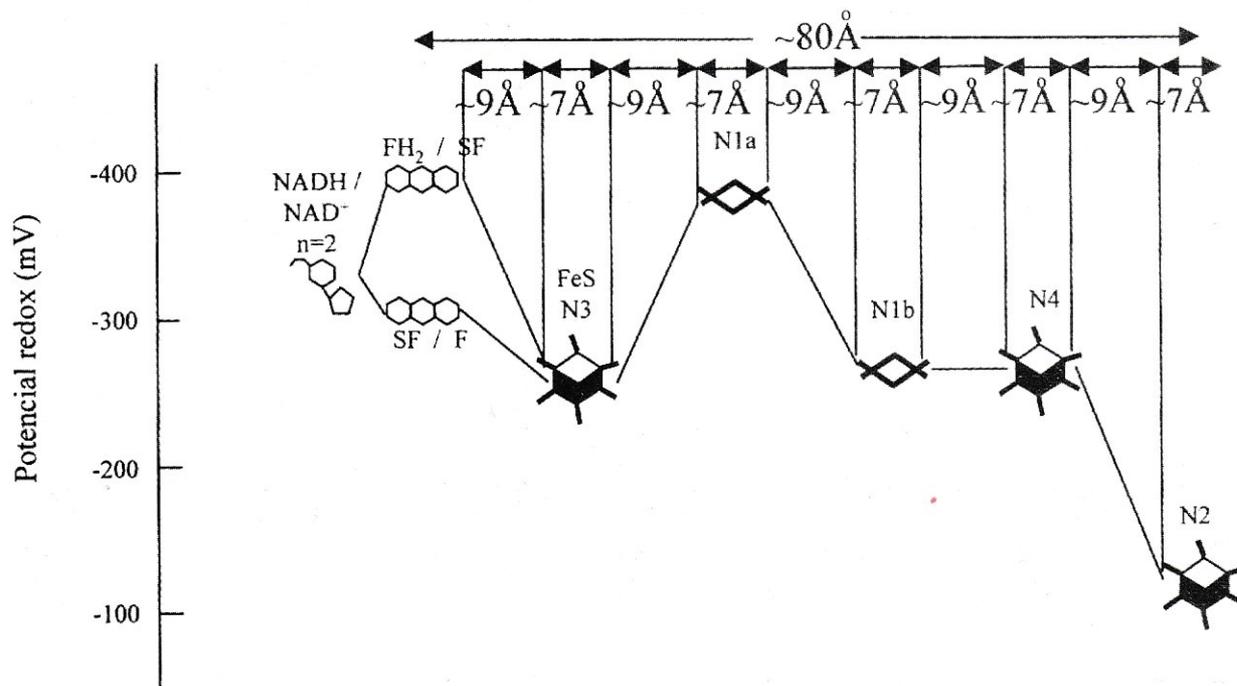


Figura 3. Potenciales redox medio y distancia entre los cofactores redox del complejo I. Tanto los potenciales redox medio como la distancia que separa a los diferentes cofactores redox son los apropiados para que el complejo I catalice la transferencia de los electrones del NADH a la quinona con rapidez y eficiencia (Figura tomada de la referencia 2).

Mecanismo del bombeo de protones

El mecanismo que se muestra en la Fig. 4 es todavía hipotético, pero explica la estequiometría del bombeo de protones con el transporte de electrones en el complejo I (10). El modelo requiere de varios sitios de unión para la quinona (Q_{nz} , Q_{ny} y Q_{nx}) con propiedades diferentes (10). Los sitios Q_{nz} y Q_{nx} pueden intercambiar Q/QH_2 con la poza de quinonas en la membrana (Q_{poza}). El sitio Q_{nz} tiene acceso a los protones que provienen del lado de la matriz mitocondrial o lado N, mientras que el sitio Q_{nx} tiene acceso a los protones en el lado citosólico de la membrana o lado P. Por otra parte, el sitio Q_{ny} , cargado con una quinona que no está en contacto con la poza de quinonas en la membrana, puede adoptar dos conformaciones: una de ellas conecta a la quinona en el sitio Q_{ny} con los protones de la matriz mitocondrial, probablemente a través de un canal, mientras que en la otra conformación la quinona está en contacto con los protones del lado citosólico de la membrana (10).

Con estas propiedades del modelo, se puede explicar el acoplamiento del bombeo de H^+ con la reacción de oxidorreducción en el complejo I por medio

del ciclo catalítico que se muestra en la Fig. 4 y que se describe a continuación:

1. El NADH se une al complejo I y los sitios Q_{nz} y Q_{nx} toman una ubiquinona (Q) y un ubiquinol (QH_2), respectivamente, de la poza de quinonas en la membrana.
2. El centro N2 se reduce con la participación de una cadena de centros redox en la que intervienen el FMN y varios centros hierro-azufre.
3. El N2 reduce a la quinona que se encuentra en el sitio Q_{nz} y se forma una semiquinona (SQ) inestable.
4. La semiquinona en el sitio Q_{nz} oxida al quinol QH_2 que se encuentra en el sitio Q_{ny} . En este paso ocurren dos eventos: la SQ en el sitio Q_{nz} se reduce a QH_2 y une dos protones que provienen de la matriz, y el quinol QH_2 en el sitio Q_{ny} se oxida a SQ y se libera un protón en el lado citosólico de la membrana.
5. Se lleva a cabo un cambio conformacional del complejo I, de tal manera que la SQ en el sitio Q_{ny} queda accesible a los protones del lado de la matriz mitocondrial.
6. En esta conformación, QH_2 en el sitio Q_{nx} puede reducir a la SQ en el sitio Q_{ny} en un proceso en el que se capta un protón del lado de la matriz y se libe-

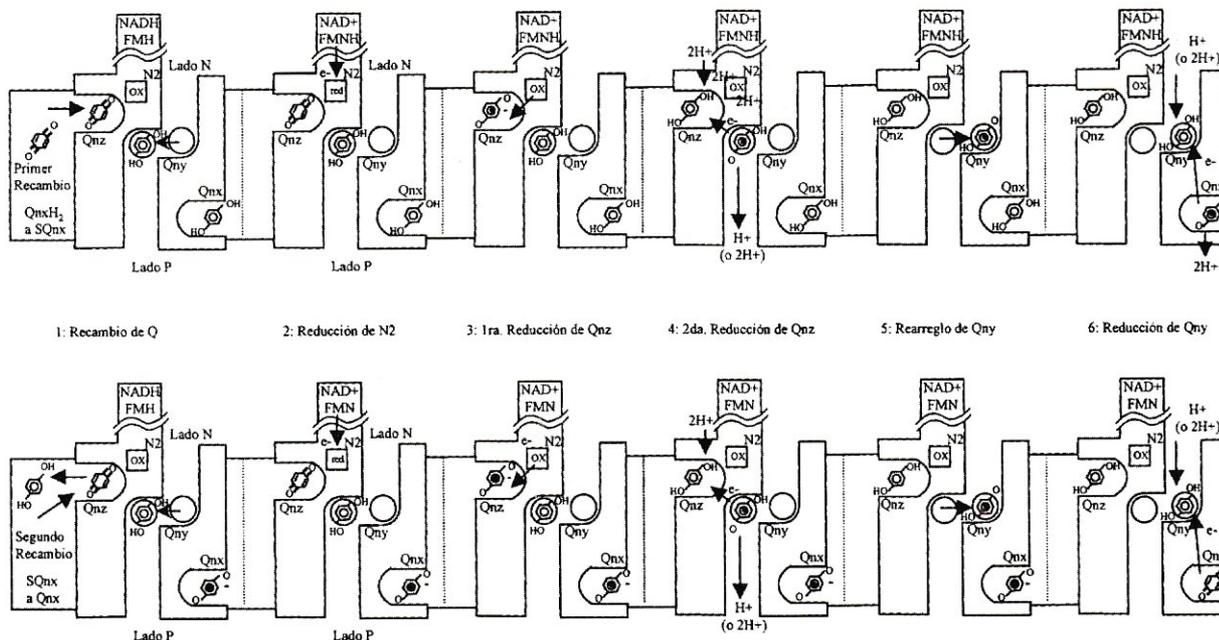


Figura 4. Modelo para la conversión de energía del complejo I. El complejo I se representa como una proteína transmembranal con un cuello en donde se localizan el NADH, el FMN y los centros hierro-azufre, los cuales transfieren sus electrones al centro N2. Hay dos sitios de unión para las quinonas, denominados Q_{nz} y Q_{nx} , que pueden intercambiar Q/QH_2 con la poza de quinonas en la membrana interna mitocondrial. Los números del 1 al 6, representan las etapas por las que pasa el complejo I, tanto en la parte superior como en la inferior (Figura tomada de la referencia 10).

ran dos protones hacia el lado citosólico. En la primera parte del ciclo catalítico (parte superior de la Fig. 4), se puede ver que la oxidación de QH_2 en el sitio Q_{nx} se asocia con la generación de un anión SQ^- y la liberación de tres protones hacia el citosol.

7. En la siguiente etapa, el quinol que se encuentra en el sitio Q_{nz} se intercambia con una quinona y el complejo I sufre un segundo cambio conformacional que lleva al QH_2 en el sitio Q_{ny} a una posición en la cual está en contacto con los protones del citosol.

8. Un segundo electrón que proviene de la semiflavona llega al centro N2.

9. El electrón viaja del N2 a la ubiquinona en el sitio Q_{nz} , con lo cual se forma una semiquinona SQ^- .

10. La semiquinona en el sitio Q_{nz} recibe un electrón del QH_2 que se encuentra en el sitio Q_{ny} ; durante este paso, se captan dos protones del lado de la matriz (que se unen a la semiquinona para formar el QH_2 en el sitio Q_{nz}) y se bombea un protón hacia el citosol (que proviene del QH_2 en el sitio Q_{ny}).

11. Se lleva a cabo un cambio conformacional que

mueve a la semiquinona en el sitio Q_{ny} hacia el canal que mira al lado de la matriz mitocondrial.

12. Esta semiquinona toma dos protones del lado de la matriz mitocondrial y recibe un electrón de la semiquinona que reside en el sitio Q_{nx} , con el resultado de que en esta etapa se produce una quinona en el sitio Q_{nx} y un quinol en el sitio Q_{ny} .

13. En la última etapa del ciclo catalítico hay un cambio conformacional que lleva a la enzima a su estado inicial, con una quinona en el sitio Q_{nz} , un QH_2 en el sitio Q_{ny} y en contacto con los protones del lado citosólico a través de un canal y un QH_2 en el sitio Q_{nx} .

Inhibidores del complejo I

Existe una gran cantidad de inhibidores que interactúan con el complejo I, algunos de origen natural, como los rotenoides y las piericidinas, y otros de origen sintético, como el amital y ciertos pesticidas (13). Con base en un criterio funcional, los inhibidores del complejo I se pueden dividir en tres tipos: A, B y C (13). En la Fig. 5 se muestra un modelo del complejo I, con tres

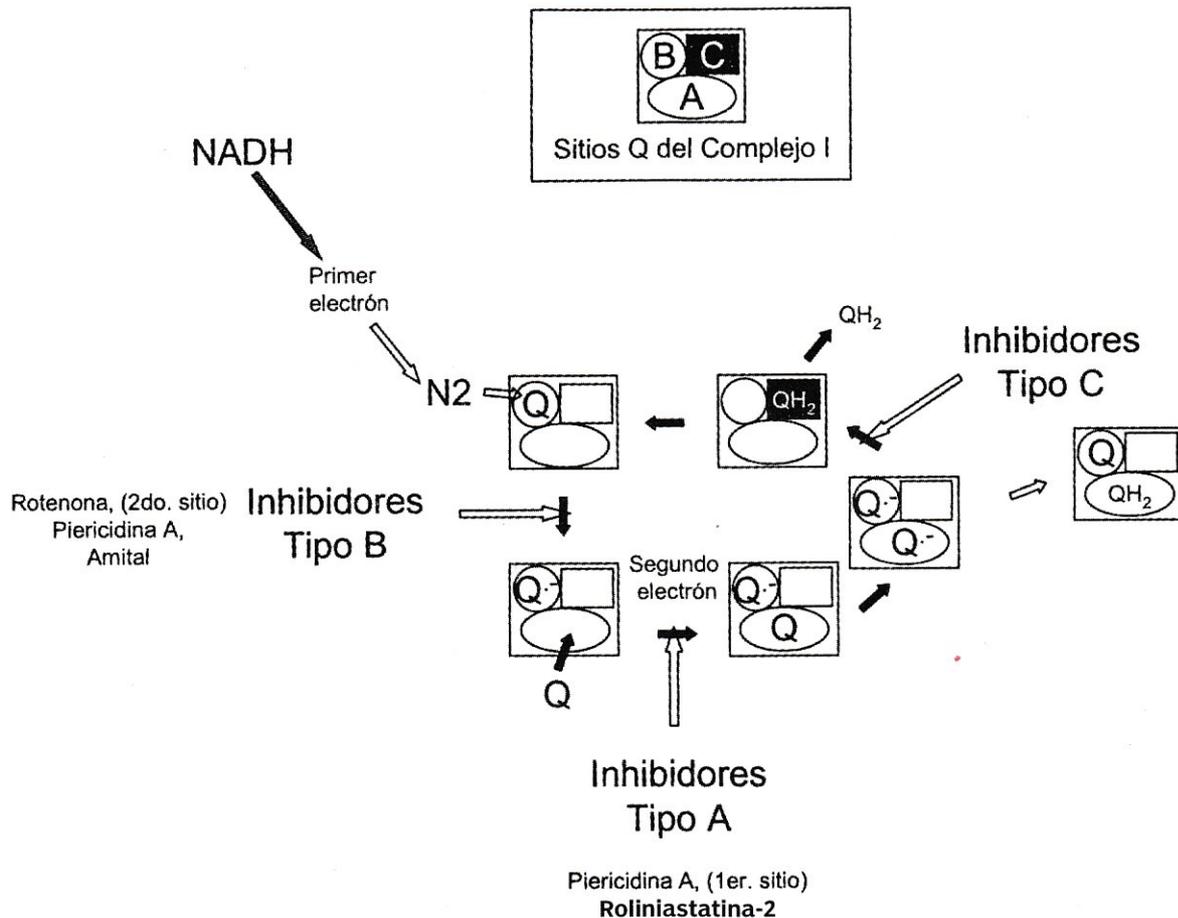


Figura 5. Esquema del sitio de acción de los tres tipos de inhibidores del complejo I. (Figura tomada de la referencia 13).

sitios para la quinona, que explica el efecto de los inhibidores, en donde algunos pueden tener dos sitios de asociación. Los del tipo B (rotenona, piericidina A y amital) inhiben la entrada de la quinona al sitio A, mientras que los inhibidores del tipo A (piericidina A y roliniastatina-2) bloquean la reducción de la quinona que se encuentra en el sitio A por el segundo electrón que proviene del centro N2 (13). Nótese que la piericidina A es un inhibidor que pertenece tanto a la clase A como a la B, ya que interactúa con dos sitios independientes en el complejo I, por lo que su comportamiento cinético es complejo. Los inhibidores del tipo C, como el mixotiazol, la estigmatelina y la meperidina, bloquean la formación del quinol en el sitio C y estabilizan el complejo con el quinol en el sitio A (13).

Otras NADH deshidrogenasas

Las mitocondrias de algunas levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, contienen al menos dos diferentes NADH:ubiquinona₆ oxidorreductasas en la membrana interna mitocondrial; ambas son insensibles a la rotenona y no bombean protones a través de la membrana (17). Ninguna de ellas se encuentra en las mitocondrias de mamífero. Una de las enzimas, la NADH deshidrogenasa externa, tiene su sitio activo en el espacio intermembranal y está involucrada en la oxidación del NADH que se produce en el citosol (18); se considera que esta enzima tiene un papel fisiológico equivalente al de la lanzadera de malato/

aspartato presente en los eucariontes superiores, pero que está ausente en *S. cerevisiae*. La NADH deshidrogenasa externa también se encuentra en las mitocondrias de las plantas y de los hongos (19, 20).

El sitio activo de la otra deshidrogenasa, la NADH deshidrogenasa interna, se localiza en la matriz mitocondrial (21). Esta enzima se encarga de oxidar al NADH que se produce en el ciclo de Krebs y como resultado de la actividad de la alcohol deshidrogenasa mitocondrial. Su papel fisiológico es el de suplir al complejo I, ya que esta levadura carece de complejo I (17). A diferencia del complejo I clásico, estas enzimas son estructuralmente más sencillas, con una sola subunidad que tiene al FAD como grupo prostético unido no covalentemente; además, no presenta centros hierro azufre.

Una enzima similar a la NADH deshidrogenasa interna está presente en *E. coli* y en otros procariontes (22) (Tabla I). Al comparar la secuencia de estas dos proteínas se observa un 22.2% de residuos idénticos. La enzima de bacteria carece de una secuencia líder y la similitud es mayor en los primeros 400 aminoácidos de la cadena polipeptídica, con una diferencia mayor en la región del carboxilo terminal. Ambas deshidrogenasas catalizan el mismo tipo de reacción de oxidorreducción, contienen el mismo grupo prostético (FAD) y se encuen-

TABLA I

CARACTERISTICAS DE LAS NADH-DESHIDROGENASAS AISLADAS DE VARIOS ORGANISMOS

ORGANISMO	MASA MOLECULAR DE LA SUBUNIDAD (kDa)	GRUPO PROSTETICO	COCIENTE FLAVINA/SUBUNIDAD (mol/mol)
<i>Bacillus subtilis</i>	63	FAD	-
<i>Bacillus caldotenax</i>	44	FAD	-
<i>Alcalofilo Bacillus YN1</i>	65	FAD	1
<i>Escherichia coli</i>	47	FAD	1
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	43	-	-
<i>Thermus thermophilus</i>	50	FAD	1
<i>Thermus aquaticus</i>	50	FMN	0.05
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	50	-	-
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	-	FAD	-
<i>Halobacterium cutirubrum</i>	-	FAD	-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (mitocondrias)	53	FAD	0.9

tran unidas a la membrana. Asimismo, se ha reportado que las mitocondrias de las plantas y de *N. crassa* contienen una NADH deshidrogenasa interna (19, 20). En la membrana mitocondrial interna de estos organismos, con la excepción de *S. cerevisiae*, coexisten la NADH deshidrogenasa interna insensible a rotenona y la NADH deshidrogenasa sensible a rotenona. El significado fisiológico de la presencia de ambas vías no es claro, aunque la expresión de éstas es función del estado metabólico del organismo. Por ejemplo, cuando se cosecha a la levadura *Candida utilis* en la fase logarítmica de crecimiento, sus mitocondrias carecen del complejo I y la actividad de NADH deshidrogenasa que presentan es insensible a rotenona, mientras que en la fase estacionaria, aparece el complejo I con sensibilidad a la rotenona (16).

En estas deshidrogenasas el transporte de electrones se realiza del NADH al grupo prostético FAD de la enzima, en un proceso en el que los dos electrones se transfieren simultáneamente, razón por la cual no se producen radicales libres del tipo de la semiquinona o semiquinona (21). Posteriormente los dos electrones pasan a la quinona que se encuentra en la membrana. La actividad de oxidorreducción de estas enzimas se lleva a cabo sin que haya transporte de protones a través de la membrana, por lo que su actividad no genera un gradiente de potencial electroquímico de protones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo que recibieron de la UNAM a través de la DGAPA (IN200897 para JPP; IN202496 y IN200399 para FM), y del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (201436 para IV) y del CONACyT (26096M para FMM). IV fue becada por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico para estudios de doctorado.

REFERENCIAS

1. Larsson S (1998) Electron transfer in proteins. *Biochim Biophys Acta* 1365: 294-300.
2. Dutton PL, Chen X, Page CC, Huang S, Ohnishi T y Moser CC (1998) Respiratory Electron Transfer Chains. *Biological Electron Transfer Chains: Genetics, Composition and Mode of Operation* pp:3-8. Eds. GW Canters y E Vigenboom. Kluwer Academic Publishers.
3. Page CC, Moser CC, Chen X y Dutton PL (1999) Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402: 47-52.
4. Grigorieff N (1998) Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *J Mol Biol* 277: 1033-1046.
5. Grigorieff N (1998) Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Curr Opin Struct Biol* 9: 476-483.
6. Guénebaud V, Vincentelli R, Mills D, Weiss H y Leonard KR (1997) Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J Mol Biol* 265: 409-418.
7. Videra A (1998) Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* 1364: 89-100.
8. Friedrich T (1998) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1364: 134-146.
9. Yagi T, Yano T, Di Bernardo S y Matsuno-Yagi A (1998) Prokaryotic complex I (NAD-1), an overview. *Biochim Biophys Acta* 1364: 125-133.
10. Dutton PL, Moser CC, Sled VD, Daldal F y Ohnishi T (1998) A reductant-induced oxidation mechanism for Complex I. *Biochim Biophys Acta* 1364: 245-257.
11. Brandt U (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta* 1318: 79-91.
12. Ohnishi T, Sled VD, Yano T, Yagi T, Burbaev DS y Vinogradov AD (1998) Structure-function studies of iron-sulfur clusters and semiquinones in the NADH-Q oxidoreductase segment of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1365: 301-308.
13. Degli-Esposti M (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta* 1364: 222-235.
14. Friedrich T, Weidner U, Nehls U, Fecke W, Schneider R y Weiss H (1993) Attempts to define distinct parts of NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Bioenerg Biomembr* 25: 331-337.
15. Guénebaud V, Schlitt A, Weiss H, Leonard K y Friedrich T (1998) Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol* 276: 105-112.
16. Ohnishi T (1998) Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim Biophys Acta* 1364: 186-206.

17. De Vries S y Marres C (1987) The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta* 895: 205-239.
18. Luttik MA, Overkamp KM, Kotter P, de Vries S, van Dijken JP y Pronk JT (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem* 273: 24529-24534
19. Rasmusson AG, Svensson AS, Knoop V, Grohmann L y Brennicke A (1999) Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenase in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J* 20: 79-87.
20. Melo AM, Duarte M y Videira A (1999) Primary structure and characterization of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 141: 282-287.
21. De Vries S y Grivell LA (1988) Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 176: 377-384.
22. Yagi T (1991) Bacterial NADH-Quinone oxidoreductases. *J Bioenerg Biomemb* 23: 211-225.

EL COMPLEJO II: LA SUCCINATO DESHIDROGENASA DE LA CADENA RESPIRATORIA

Juan Pablo Pardo, Federico Martínez, Guadalupe Guerra e Isabel Velázquez. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Bioquímica Microbiana. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Apdo. Postal 4-870. CP 06400, México, D. F. Tel. 57-29-60-00. Correo electrónico: lupegs@hotmail.com.

Recibido: 5 de octubre de 1999. Aceptado: 12 de diciembre de 2000.

RESUMEN

La succinato deshidrogenasa pertenece a una familia de enzimas de membrana que catalizan la oxidación del succinato o la reducción del fumarato, utilizando a una quinona como segundo sustrato. Las enzimas de esta familia contienen un dominio periférico formado por dos subunidades y otro dominio membranal constituido por una o dos subunidades. Además de tener al FAD como grupo prostético, presentan varios centros hierro-azufre que participan en la transferencia de los electrones. Algunos miembros de la familia presentan uno o dos grupos hemo en el dominio membranal.

PALABRAS CLAVE: Complejo II, FAD, centros hierro azufre, grupos hemo.

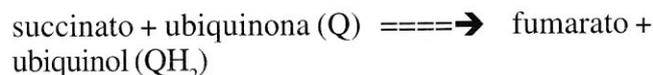
ABSTRACT

The succinate dehydrogenase belongs to a family of membrane enzymes that catalyze the oxidation of succinate or the reduction of fumarate, using a quinone as a second substrate. The enzymes of this family contain a periferic domain with two hydrophylic subunits and a membrane domain with one or two highly hydrophobic proteins. In addition to the prosthetic group FAD, the enzymes contains several iron-sulfur centers that participate in the transfer of electrons.

KEY WORDS: Complex II, FAD, iron-sulfur centers, heme groups.

INTRODUCCIÓN

El complejo II o succinato deshidrogenasa cataliza la oxidación del succinato a fumarato en el ciclo de Krebs y dona los electrones a la ubiquinona en la membrana. La reacción de oxidorreducción no está acoplada con la translocación de protones a través de la membrana, por lo que se puede resumir en la siguiente ecuación:



En la Fig. 1 se observa que la enzima contiene un dominio periférico, expuesto a la matriz mitocondrial, y un dominio membranal que tiene el o los sitios de unión para la ubiquinona (1). La parte periférica está formada por dos subunidades. La primera de ellas, la subunidad A, es una flavoproteína que tiene el sitio de unión para el succinato y, como grupo prostético, un FAD unido covalentemente (1). La segunda proteína, la subunidad B, presenta tres centros hierro-azufre, denominados S1, S2 y S3. El S1 es un centro hierro-

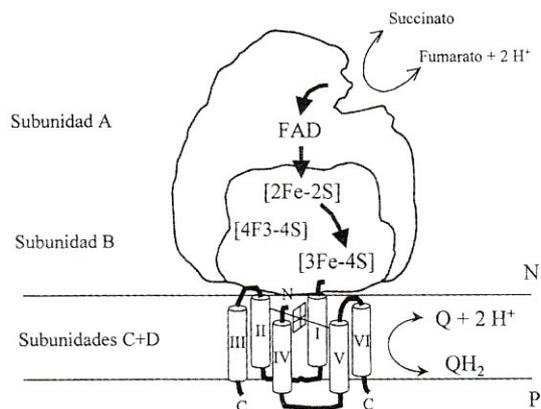


Figura 1. Esquema del complejo II. Este complejo está formado por una región periférica y otra membranal. (Figura tomada de la referencia 2).

azufre del tipo (2Fe-2S), el S2 es un centro ([4Fe-4S]) y el S3 es ([3Fe-4S]) (1). Los centros hierro-azufre que se localizan en el dominio periférico, así como el grupo prostético FAD, son esenciales para que se lleve a cabo el transporte de electrones dentro de la proteína durante la reacción de oxidorreducción. Por otra parte, el dominio membranal contiene dos cadenas polipeptídicas, las subunidades C y D, cada una con una masa molecular de 11-15 kDa y tres segmentos transmembranales que tienen una estructura secundaria de alfa hélice (2, 3). Las regiones amino terminal

de estas subunidades se encuentran en el lado de la matriz mitocondrial, mientras que el extremo carboxilo está en el espacio intermembranal (2, 3). Además, hay una molécula de protohemo IX asociada a estas subunidades de membrana. Sin embargo, la participación de este grupo en el transporte de electrones es dudosa, ya que en *Escherichia coli*, en donde la enzima cataliza la reducción del fumarato para producir succinato, la enzima funciona en ausencia de este cofactor. Asimismo, el complejo II de las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* carece del protohemo IX, por lo que hasta el momento se desconoce su posible papel funcional en la actividad enzimática (1 - 3).

Clasificación funcional de las succinato:quinona oxidorreductasas

Desde un punto de vista funcional, las enzimas de esta familia se pueden clasificar en tres clases (Fig. 2). La clase 1 o succinato:quinona oxidorreductasa (SQR) cataliza la oxidación del succinato por una quinona de alto potencial, teniendo como aceptor de electrones a la ubiquinona (1). A esta clase pertenece la enzima que se encuentra en la mitocondria de mamíferos y también en la membrana plasmática de muchos procariones. La clase 2 o quinol:fumarato reductasa (QFR) cataliza la reducción del fumarato y la oxidación de un quinol de bajo potencial, como el menaquinol o el rodoquinol (1). La clase 3 también contiene enzimas que catalizan la oxidación del succinato (SQR), pero utilizan como aceptor de electrones a una quinona de bajo potencial, como la menaquinona o la termoplasmaquinona (1). Este tipo de enzimas se encuentra en *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Thermoplasma acidophilum* y en otras bacterias gram positivas y arqueobacterias.

Clasificación estructural de las succinato:quinona oxidorreductasas

De acuerdo con el número de subunidades y de grupos hemo que se encuentran asociados al dominio

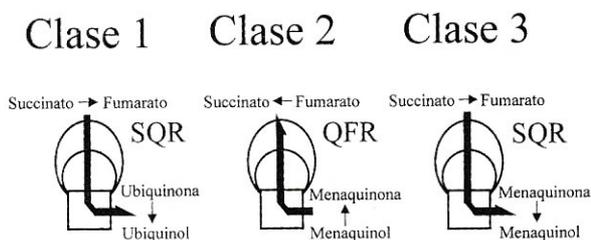


Figura 2. Clasificación de las succinato deshidrogenasas. (Figura tomada de la referencia 1).

membranal, estas proteínas se clasifican en cuatro tipos, denominados A, B, C y D (Tabla I) (1).

El tipo A se caracteriza por tener dos grupos hemo y dos subunidades en la membrana, cada una de ellas con tres cruces transmembranales; está representado por la SQR de *T. acidophilum* (1).

El tipo B tiene una sola subunidad en la membrana, con cinco segmentos transmembranales y dos grupos hemo. Como ejemplos de este tipo está la SQR de *B. subtilis* y la QFR de *Wolinella succinogenes* (1). Recientemente se determinó la estructura cristalográfica de la fumarato reductasa de *W. succinogenes* (4). La estructura básica es la descrita anteriormente: dos subunidades que forman el dominio periférico y una tercera subunidad que corresponde al dominio membranal (4). Son varias las interacciones que mantienen al FAD unido a la subunidad A. Por una parte, el anillo de isoaloxazina del FAD se une covalentemente a la histidina 43 de la subunidad A; pero además, la molécula del FAD participa en la formación de al menos 15 puentes de hidrógeno con diferentes residuos de aminoácidos (4). La subunidad A contiene el sitio del dicarboxilato, formado por el mismo anillo de isoaloxazina del FAD, dos residuos de arginina, uno de histidina y otro de fenilalanina. Los tres centros hierro-azufre de la subunidad B están coordinados por diferentes residuos de cisteína (4). La subunidad C es la proteína que forma el dominio membranal y contiene cinco segmentos transmembranales y dos grupos hemo *b* coordinados a diferentes histidinas (4). A estos grupos hemo se les denomina *b_p* y *b_d* (el subíndice "P" viene de proximal, por estar más cerca del dominio hidrofílico, y el subíndice "D" de distal, por estar más lejos).

También se encontraron dos sitios para las quinonas, uno proximal y el otro distal (4). La quinona proximal es la que se encuentra cerca del hemo *b_p*, mientras que la quinona distal está más próxima al hemo *b_d*. La separación que existe entre los dos hemo *b*, que es tan solo de 4.2 Å, y la distancia tan corta a la que se encuentra el hemo *b_p* del centro hierro-azufre (3Fe-4S), sugiere que uno o los dos grupos hemo *b* participan en la transferencia de electrones. Según Lancaster y col. (4) un camino probable para el flujo de los electrones es la siguiente secuencia: quinona => hemo *b_d* o hemo *b_p* => (3Fe-4S) => (4Fe-4S) => (2Fe-2S) => FAD => dicarboxilato (Fig. 3). Sin

TABLA I

CLASIFICACION ESTRUCTURAL DE LAS SUCCINATO: QUINONA OXIDORREDUCTASA

CLASE O TIPO	SUBUNIDADES EN EL DOMINIO MEMBRANAL	GRUPOS HEMO EN EL DOMINIO MEMBRANAL	TIPO DE ACTIVIDAD
A	2	2	SQR
B	1	2	SQR y QFR
C	2	1	SQR
D	2	0	SQR y QFR

embargo, si la quinona proximal es la que participa en la reacción de oxidorreducción, entonces es posible que los electrones pasen directamente al centro hierro-azufre (3Fe-4S), por lo que los grupos hemo estarían fuera de la trayectoria de los electrones.

El tipo C presenta dos subunidades, con tres segmentos transmembranales cada una de ellas, y un solo grupo hemo asociado a estas dos proteínas; las enzimas que pertenecen a esta categoría son las más comunes, y se encuentran en las mitocondrias de mamífero y en *E. coli* (1). En ambos casos, la enzima tiene actividad de SQR.

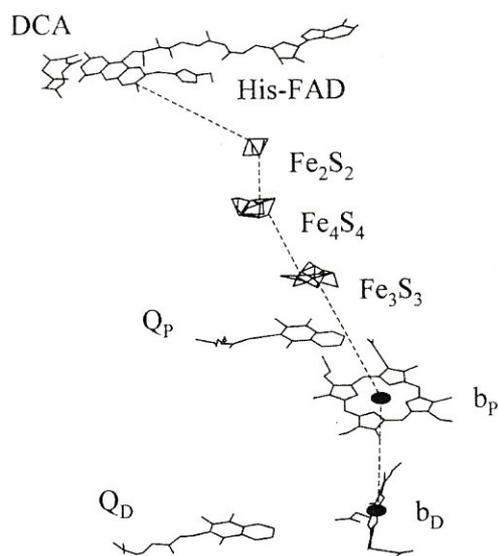


Figura 3. Trayectoria probable del transporte de los electrones en la fumarato reductasa de *Wolinella succinogenes*. DCA, dicarboxilato. (Figura tomada de la referencia 4)

El tipo D contiene dos subunidades sin grupo hemo. Las enzimas de este tipo se encuentran en *E. coli* con actividad de QFR, en *Sulfolobus acidocaldarius* con actividad de SQR y aparentemente en *S. cerevisiae* con actividad de SQR (1). Recientemente se obtuvo la estructura cristalográfica de la fumarato reductasa (QFR) (5). La subunidad Fp, con una masa molecular de 66 kDa, tiene unido covalentemente al FAD y contiene el sitio para el dicarboxilato. Los tres centros hierro-azufre se encuentran en la subunidad Ip (27 kDa). El dominio transmembranal carece de grupos hemo y está formado por dos proteínas de membrana (13 y 15 kDa), cada una con tres segmentos transmembranales (5). La porción membranar contiene dos sitios de unión para la quinona, uno distal y otro proximal. La separación entre Q_p y Q_d es de 27 Å, por lo que es muy poco probable que exista transferencia de electrones entre ellos (5). La estructura cristalográfica de la proteína sugiere que los electrones van de la quinona proximal Q_p al (3Fe-4S) \Rightarrow (4Fe-4S) \Rightarrow (2Fe-2S) \Rightarrow FAD \Rightarrow dicarboxilato (Fig. 4) (5). Puesto que la separación de centro a centro entre estos grupos redox es de 11 a 14 Å, la transferencia de los electrones se lleva a cabo rápidamente (5).

Transporte de electrones en el Complejo II de las mitocondrias

En el complejo II existe un arreglo de los grupos redox similar al descrito para el complejo I (Fig. 5) (6). En primer término, la succinato deshidrogenasa tiene unido covalentemente al FAD (F), el cual funciona como el aceptor inicial de los electrones del succinato. De aquí, los electrones 1 viajan a través de

los tres centros hierro-azufre S1, S2, S3, hasta llegar a la quinona (Q). Al igual que en el complejo I, la reducción del FAD se lleva a cabo por la transferencia de dos electrones. Posteriormente, el FADH_2 (FH_2) se transforma en una semiflavona (SF) al ceder un electrón al centro S1. El electrón se transfiere del centro S1 al S2, de aquí al S3 y finalmente a la Q para dar una SQ (6). Hay evidencias experimentales que indican que el centro hierro-azufre S3 se encuentra cerca del sitio de unión de la Q.

Para completar la reducción, el electrón de la SF viaja por la misma trayectoria hasta la SQ, con lo que se produce la hidroquinona o quinol (QH_2). La separación entre los centros redox es de 8 a 10 Å, por lo que la transferencia de electrones es eficiente (6). Otro punto importante es que el transporte de electrones se lleva a cabo en microsegundos, a pesar de

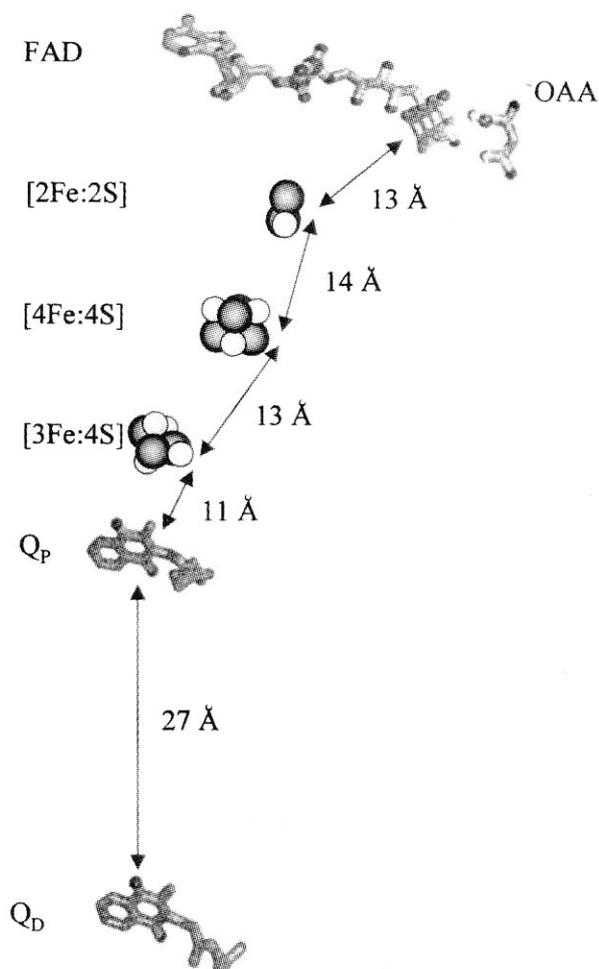


Figura 4. Trayectoria probable de los electrones en la fumarato reductasa de *Escherichia coli*. OAA, oxaloacetato. (Figura tomada de la referencia 5).

que existan pasos termodinámicamente desfavorables, como es el transporte de electrones del centro hierro-azufre S1 al S2 ($\Delta G^\circ = +0.3 \text{ eV}$) y un cambio muy pequeño en la energía libre de la reacción global ($\Delta(G^\circ = -0.07 \text{ eV})$). Sin embargo, esta barrera se puede sobreponer con facilidad por medio de la energía de activación térmica si los componentes de la cadena respiratoria están lo suficientemente cercanos (6).

Características cinéticas

En un estudio reciente se compararon las actividades de la succinato deshidrogenasa y de la fumarato reductasa de *E. coli* (7). Las dos enzimas tienen una cinética de saturación de tipo hiperbólica; ambas catalizan la oxidación del succinato y la reducción del fumarato, aunque con una diferente eficiencia (7). Por ejemplo, la succinato deshidrogenasa (SQR), en presencia de Q_1 (un análogo de la quinona que tiene una sola unidad isoprenoide), oxida al succinato con una $K_{m \text{ Q}_1}$ de $2 \mu\text{M}$ y una k_{cat} de 87 s^{-1} , pero reduce al fumarato con una $K_{m \text{ Q}_{1\text{H}_2}}$ de $5 \mu\text{M}$ y una k_{cat} de 1.5 s^{-1} (7). Por tanto, puede concluirse que la succinato deshidrogenasa está diseñada para oxidar al succinato. Por el contrario, la fumarato reductasa trabaja mucho mejor en el sentido de la reducción del fumarato, con una k_{cat} de 177 s^{-1} que es 12.6 veces mayor que el valor de la k_{cat} (14 s^{-1}) en el sentido de la oxidación del succinato. En este experimento se utilizó a la menaquinona como donador de electrones. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, las dos enzimas

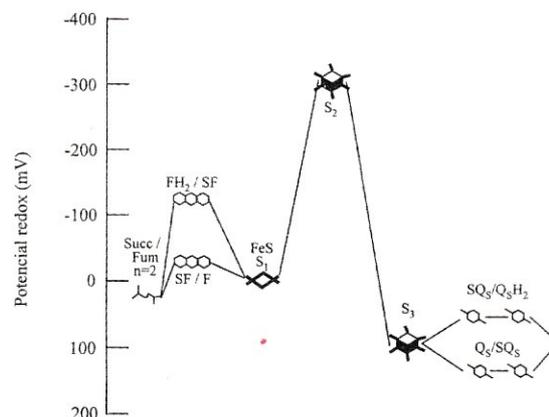


Figura 5. Esquema de la transferencia de electrones en el complejo II. Se muestran los potenciales redox medio y la distancia probable entre los cofactores redox del complejo II. Tanto los potenciales redox medio como la distancia que separa a los diferentes cofactores redox son las apropiadas para que el complejo II catalice la transferencia rápida de los electrones del succinato a la quinona. (Figura tomada de la referencia 6).

muestran comportamientos similares en función del pH (7). En el sentido de la oxidación del succinato se obtiene un pK_a de 7.4 (QFR) o de 7.6 (SQR), consistente con la titulación de una histidina (7) o una cisteína (8) que está involucrada en la actividad de la enzima. Cuando este residuo se desprotona, la enzima pierde actividad. En el sentido de la reducción del fumarato se obtiene un pK_a de 6.6 (QFR) y de 6.9 (SQR). Estos valores también son consistentes con la protonación de una histidina en el sitio activo de la enzima. Al igual que en el caso anterior, cuando este residuo se desprotona, la enzima se inhibe (7).

El complejo II de las mitocondrias de corazón de res tiene un comportamiento cualitativamente similar (8). En los ensayos enzimáticos se utilizó Q_2 , un análogo de la quinona fisiológica con dos unidades isoprenoides. La enzima mitocondrial tiene una mayor afinidad por la quinona, oxidada o reducida, que por el succinato o el fumarato (8). Por ejemplo, en el sentido de la oxidación del succinato, la K_m para el succinato es de 130 μM , mientras que la K_m para Q_2 es de 0.3 μM (8). Lo mismo ocurre en el sentido de la reducción del fumarato: la K_m del fumarato (25 μM) es mayor que la K_m de Q_2H_2 (1.5 μM). Por otro lado, a pesar de que la K_m para el succinato (130 μM) es más grande que la K_m para el fumarato (25 μM), la enzima trabaja mejor en el sentido de la oxidación del succinato (8). Esto se debe a que la velocidad máxima del complejo II en el sentido de la oxidación del succinato es 40 veces mayor que en el sentido contrario (40 $\mu\text{mol}(\text{min mg})^{-1}$ contra 1 $\mu\text{mol}(\text{min mg})^{-1}$), de tal manera que esta enzima también está diseñada para catalizar la oxidación del succinato (8). Asimismo, cuando se determinó la actividad de la enzima en ambos sentidos, en el de la oxidación del succinato y en el de la reducción del fumarato, se obtuvo un solo pK_a , con un valor de 7.0, consistente con la participación de una histidina o una cisteína en el ciclo catalítico de la enzima (8).

Inhibidores

El malonato y el oxaloacetato son potentes inhibidores que compiten con el sustrato dicarboxílico por la unión al sitio activo de la SQR, aunque la sensibilidad varía de manera importante entre las diferentes clases de SQR/QFR. Hay otros inhibidores que interfieren con la unión o el pegado de la quinona. Entre los más conocidos están el 2-treoniltrifluoroacetona (TTFA), el 5,6-dihidro-2-metil-1,4 oxatina-3-carboxalida, el 2-

n-heptil-4-hidroxiquinolina N-óxido (HQNO) y el 5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatin-3-carboxianilida (carboxina). La sensibilidad a estos inhibidores varía dependiendo del estado de oxidación de la enzima.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el apoyo que recibieron de la UNAM a través de la DGAPA (IN200897 para JPP; IN202496 y IN200399 para FM), y del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (201436 para IV) y del CONACyT (26096M para FM). IV fue becada por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico para estudios de doctorado.

REFERENCIAS

- Hägerhäll C (1997) Succinate:quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta* 1320: 107-141.
- Hägerhäll C y Hederstedt L (1996) A structural model for the membrane-integral domain of succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett* 389: 25-31.
- Hederstedt L (1998) The membrane-integral domain of succinate:quinone oxidoreductases. A secretive haem-containing domain. *Biochem Soc Trans* 26: 408-413.
- Lancaster CRD, Kroger A, Auer M y Michel H (1999) Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature* 402: 377-385.
- Iverson TM, Luna-Chávez C, Cecchini G y Rees DC (1999) Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science* 284: 1961-1966.
- Dutton PL, Chen X, Page CC, Huang S, Ohnishi T y Moser CC (1998) Respiratory Electron Transfer Chains. *Biological Electron Transfer Chains: Genetics, Composition and Mode of Operation* pp:3-8. Eds. GW Canters y E Vigenboom. Kluwer Academic Publishers.
- Maklashina E y Cecchini G (1999) Comparison of catalytic activity and inhibitors of quinone reactions of succinate dehydrogenase (succinate-ubiquinone oxidoreductase) and fumarate reductase (menaquinol-fumarate oxidoreductase) from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 369: 223-232.
- Grivennikova VG, Gavrikova EV, Timoshin AA y Vinogradov AD (1993) Fumarate reductase activity of bovine heart succinate-ubiquinone reductase. New assay system and overall properties of the reaction. *Biochim Biophys Acta* 1140: 282-292.

ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA TIMIDILATO SINTETASA EN EL DISEÑO DE FÁRMACOS ANTICÁNCER

Rogelio R. Sotelo-Mundo. Laboratorio de Biotecnología Marina, Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Hermosillo, Sonora MEXICO 83000. Correo electrónico: rrs@cascabel.ciad.mx

Recibido: 10 de octubre de 2000. Aceptado: 13 de marzo de 2001.

RESUMEN

La timidilato sintetasa (TS) es la enzima que convierte a la deoxiuridina mono fosfato (dUMP) en deoxitimidina mono fosfato (dTMP), siendo este último uno de los nucleótidos que componen el ADN. Su inhibición detiene el ciclo celular y fármacos basados en inhibidores de la TS tienen actividad anticáncer. La determinación de la estructura de TS ha sido muy importante tanto para elucidar su mecanismo enzimático como para ayudar al diseño de antifolatos. En este trabajo se revisan algunos de los avances recientes en el campo, en particular la determinación de la estructura cristalina de la TS de rata (90% idéntica a humanos) en presencia del fármaco Tomudex® (raltitrexed).

PALABRAS CLAVE: Timidilato sintetasa, antifolatos, fármaco anticancer, cristalografía de rayos X, Tomudex, raltitrexed.

ABSTRACT

Thymidylate synthase (TS) is the enzyme that synthesizes deoxythymidine monophosphate (dTMP) from deoxyuridine monophosphate (dUMP). dTMP is a precursor of DNA, and TS inhibitors have anticancer activity. Structural determination of TS has been critical in elucidating the enzymatic mechanism as well to help design new antifolate drugs. This work addresses several recent developments in the field, in particular the determination of the crystal structure of rat TS (90% identical to humans), in complex with the antifolate drug Tomudex (raltitrexed).

KEY WORDS: Thymidylate synthase, antifolates, anticancer drug, X-ray crystallography, Tomudex, raltitrexed

INTRODUCCIÓN

La timidilato sintetasa (TS, E.C. 2.1.1.45) es uno de los mejores ejemplos donde la aplicación de investi-

gación bioquímica, estructural y clínica durante cinco décadas, ha permitido elucidar su mecanismo enzimático a nivel molecular y el modo de acción de algunos fármacos. La TS es ubicua y es la única enzima que sintetiza *de novo* al nucleótido deoxitimidilato monofosfato (dTMP), requerido para la síntesis del ADN y su inhibición detiene la división celular (1). Recientemente se ha aprobado en el Reino Unido el uso del raltitrexed (Tomudex®), un inhibidor de la TS, como fármaco anticáncer. Además la TS se ha utilizado como modelo para estudiar el papel del cambio conformacional inducido por ligandos en enzimas no alostéricas. Dichos estudios han permitido sintetizar nuevos inhibidores y utilizarlos como fármacos para el control de enfermedades proliferativas como cáncer, así como infecciones bacterianas y parasitismo.

Por otro lado, la catálisis enzimática está íntimamente relacionada con el plegamiento de proteínas y su estructura, ya que las fuerzas que mantienen la estructura proteica son las mismas que permiten a los substratos unirse al sitio activo. El análisis estructural de biomoléculas ha permitido generar hipótesis sobre su función biológica, al identificar los residuos que están involucrados en la catálisis enzimática, unión de ligandos o reconocimiento celular. La disponibilidad de las técnicas de ADN recombinante y sobreexpresión de proteínas, por otro lado, permiten que el bioquímico estudie en forma profunda la estructura y función de prácticamente cualquier proteína. Una aplicación biotecnológica de la enzimología es el diseño de inhibidores, de los cuales se han obtenido fármacos en uso clínico. En esta revisión se presenta la función de la TS y su papel en el metabolismo celular, así como el desarrollo de algunos fármacos basados en la determinación de la estructura tridimensional de la enzima.

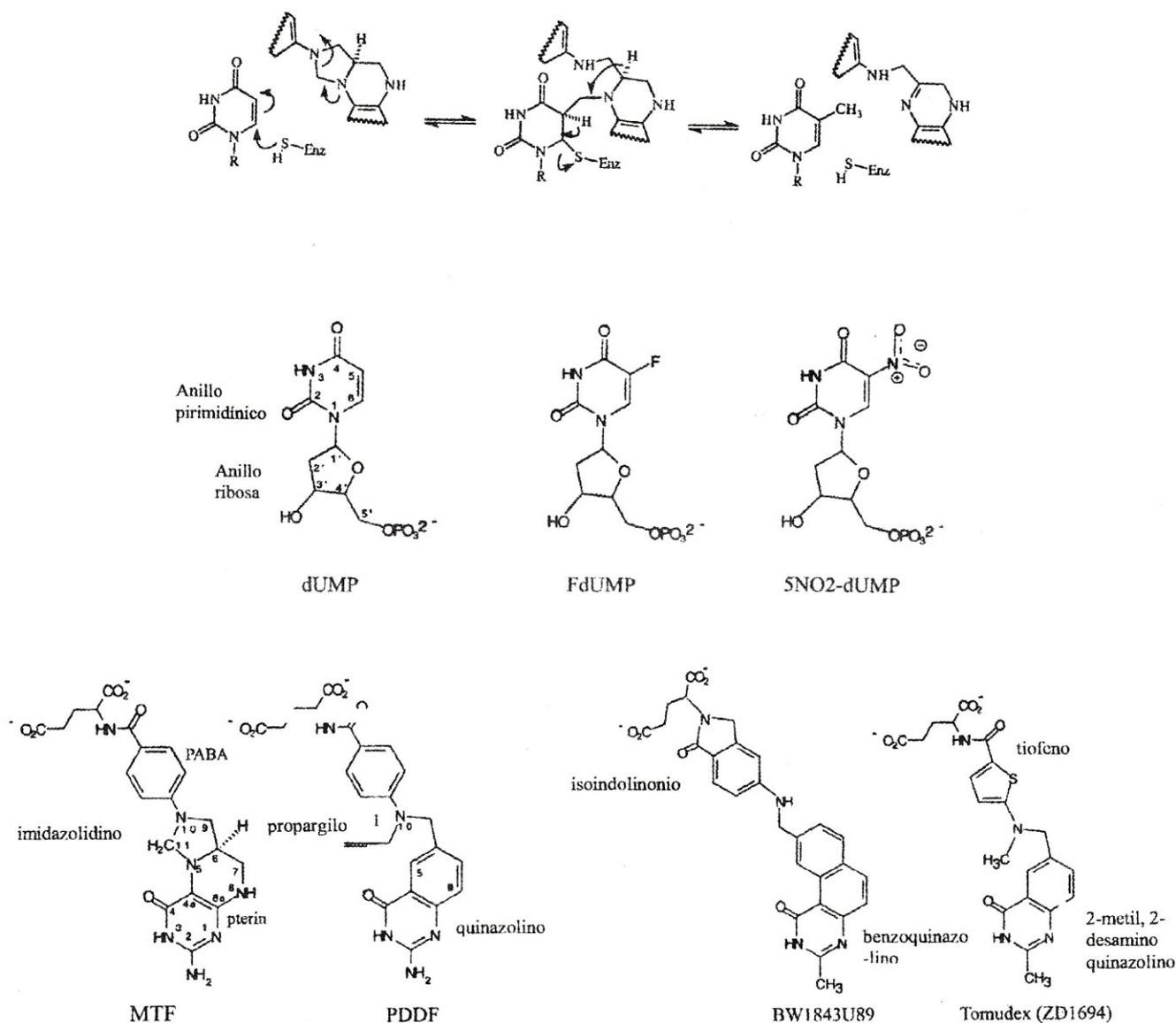


Figura 1. Mecanismo enzimático de la TS y fórmula química del sustrato, cofactor e inhibidores.

Estructura y función de la TS

La estructura de la TS se ha determinado en diferentes especies: *E. coli*, *L. casei*, humano, fago T4, enzima bifuncional TS-DHFR de *Leshmania major*, *B. subtilis* y rata. Hasta el momento existen más de 70 diferentes estructuras tridimensionales de TS reportadas, de diferentes especies, mutantes dirigidas y cristalizadas en presencia de diferentes ligandos <<http://www.rcsb.org>>.

La TS es un homodímero obligatorio, ya que hay residuos de cada monómero que contribuyen al sitio activo del monómero opuesto. La interfase entre

dímeros está formada por cinco segmentos beta plegados (Fig. 2). Tres de ellos se doblan en forma brusca (i, ii y iii) y forman una parte de la cavidad del sitio activo. Sobre de ellos se encuentran dos capas de alfa-hélices y lazos, empaquetados alrededor de una alfa-hélice central llamada "J" (2). Cada subunidad tiene un peso molecular aproximado de 36 kDa.

El sustrato 2'-deoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) y el cofactor 5,10-metilen-5,6,7,8-tetrahidrofolato (MTHF) están en contacto con 15 residuos conservados, más dos argininas (R126' y R127') del monómero opuesto que contactan al grupo fosfato

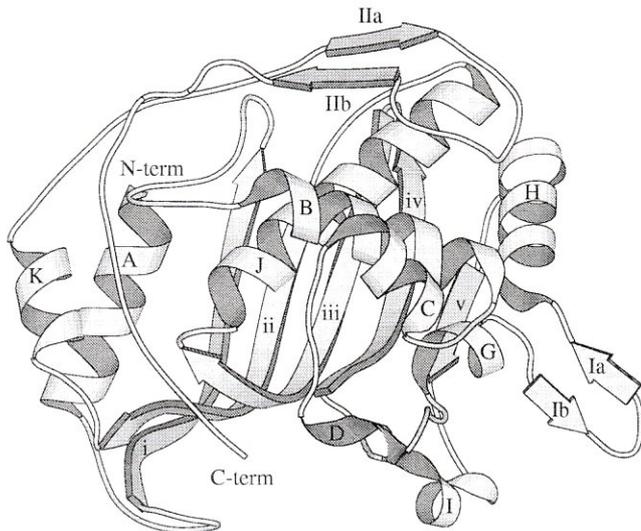


Figura 2. Representación de listón de la estructura de un monómero de TS. La nomenclatura de los elementos de estructura secundaria (ver texto) está basada en Montfort y colaboradores (1990).

del dUMP. El sitio de unión del dUMP está formado por siete aminoácidos invariantes, como se observó en el complejo binario con dUMP (Fig. 3). Dos residuos más, R21 y R127' forman puentes de hidrógeno con el grupo fosfato cuando se induce la conformación cerrada al unir MTF. ¿Cuán importantes son estos residuos para la función de la TS? Una forma de investigar esta pregunta es hacer una mutación dirigida que cambie un aminoácido por otro y determinar las propiedades cinéticas y estructurales de la proteína mutante. Por ejemplo, la asparagina 177 hace dos puentes de hidrógeno con el anillo pirimidínico del dUMP. Estos contactos son críticos para la función de la TS, ya que definen la identidad del nucleótido a metilar. Es decir, si este residuo es mutado, la TS puede unir y metilar al dCMP con gran eficiencia. En otros casos la función de un residuo es más evidente, como en el caso de las cuatro argininas que están en contacto con el grupo fosfato del dUMP. La mutación de ellas por residuos neutros disminuye la eficiencia catalítica y en algunos casos produce una enzima mutante casi inactiva.

¿Cómo convierte la TS al dUMP en 2'-deoximidina 5'-mono fosfato (dTMP)? El mecanismo de reacción de la TS se define en forma estricta como la metilación reductiva del dUMP por el cofactor MTF para producir 7,8-dihidrofolato y dTMP (1). El mecanismo de reacción se muestra en la Fig. 1. La producción de una mol de dTMP está acoplada al con-

sumo de una mol de MTF. La reacción es dependiente de la regeneración del folato, por la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la serin hidroximetilasa (3). De esa manera, inhibición de esas dos enzimas también detiene la síntesis del ADN.

La reacción se inicia cuando la cisteína catalítica (residuo 146 en la secuencia de la TS de *E. coli*) se ioniza a ion tiolato y ataca nucleofílicamente el anillo pirimidínico del dUMP, formándose un enlace covalente transitorio. Paralelamente, el anillo imidazolino del MTF se abre y reacciona con la posición 6 del anillo pirimidínico, formándose un complejo covalente ternario. En este proceso se elimina un protón, ocurre un rearrreglo de electrones y el complejo covalente se disocia en el producto dTMP y dihidrofolato (1). Aunque únicamente la cisteína 146 está en contacto covalente con los reactantes, se ha postulado que los residuos en contacto con el dUMP y MTF son importantes para unir los ligandos en forma productiva y además participan como ácidos y bases que extraen y donan protones durante el mecanismo de reacción.

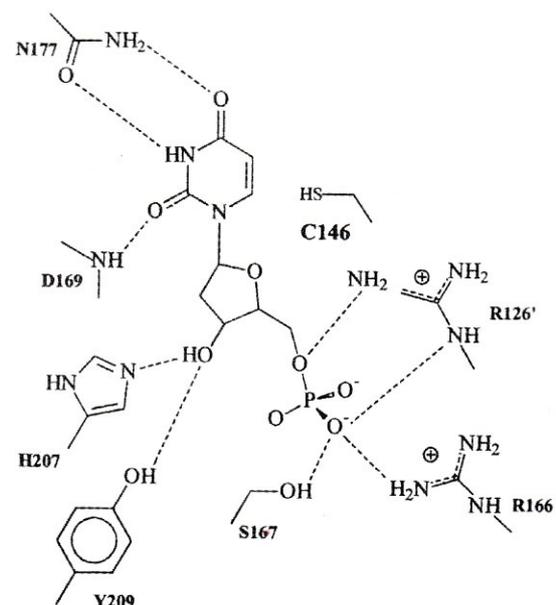


Figura 3. Representación de los contactos del sitio activo de la TS con el nucleótido dUMP. Basado en la estructura del complejo binario de la TS de *E. coli* con dUMP (Roberts y Montfort, en preparación). Los puentes de hidrógeno están representados con líneas punteadas. Los residuos R21 y R127' se mueven hacia el grupo fosfato del nucleótido cuando se une el folato y ocurre el cierre del sitio activo.

En resumen, los residuos que forman el sitio activo de la TS están conservados y la mutación de casi cualquier residuo invariante resulta en una reducción de la afinidad por los ligandos, sugiriendo que la enzima ha evolucionado para mantener un ambiente óptimo y preciso para la catálisis.

Inhibidores y Fármacos Anticáncer

TS es inhibida por análogos químicos de los nucleótidos o folatos. La importancia de los análogos de nucleótidos estriba en su efectividad como fármacos en contra del cáncer de colon (4). La síntesis del 5-fluorouracilo fue reportada en 1957, basados en la observación de que los tumores de rata rescataban el uracilo de una forma más eficiente que las células normales. La pirimidina fluorosustituida es metabolizada a FdUMP, el cual se demostró posteriormente es fuerte inhibidor de la TS. Otros análogos como la 5-fluorouridina y 5-fluorodeoxiuridina, los cuales también son metabolizados a FdUMP son utilizados en la práctica clínica (4). Estudios posteriores encontraron que la inhibición mediada por FdUMP requiere la presencia de MTF, y que dicha inhibición era a través de la formación de un complejo covalente con la cisteína catalítica (residuo 146 en la secuencia de *E. coli*). En la práctica clínica, el 5-fluorouracilo se administra junto con radiación ionizante, fármacos que dañan el ADN, antifolatos y más recientemente, inhibidores de topoisomerasas que detienen el ciclo celular a través de la inhibición de la TS y la incorporación de dUMP en el ADN (4).

El ácido fólico fue aislado en 1941 y sintetizado químicamente en 1945. Se observó que este compuesto incrementaba el crecimiento de las células leucémicas. De ahí se dedujo que los análogos químicos del ácido fólico podrían actuar como agentes citotóxicos (5). Por ejemplo, el aminopterino, un derivado 4-amino del ácido fólico, produce remisión temporal de la leucemia linfoblástica aguda infantil. Otro análogo del ácido fólico es el metotrexato, que actúa como inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa, y que se ha utilizado como fármaco anticáncer durante los últimos 50 años (5).

Se han considerado múltiples factores en la búsqueda de inhibidores de la TS químicamente similares a los folatos (6). Enzimas de la ruta biosintética del dUMP como la deoxicitidina mono fosfato (dCMP) deaminasa están reguladas negativamente por dTTP.

Entonces, la inhibición de la TS incrementa la poza de dUMP, disminuyendo el efecto inhibitorio del fluoronucleótido. Aún más, dado que los niveles de MTF en la célula son sub-óptimos para la formación del complejo ternario covalente con FdUMP, la adición de ácido fólico (leucovorin) potencia la actividad biológica del 5-fluorouracilo.

Otro interés en la terapia de antifolatos, fue la observación de que éstos no requieren una activación metabólica y no eran catabolizados. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que los antifolatos sí son metabolizados por la folil-poliglutamato sintetasa al modificarlos con glutamatos unidos mediante enlaces peptídicos tipo gama. Esta modificación hace que el fármaco sea mantenido en forma intracelular y además aumente su afinidad por la TS.

De entre los múltiples antifolatos sintetizados y analizados por su actividad biológica, se destaca el PDDF (Fig. 1), que inhiben a la TS humana con una constante de inhibición (K_i) de 10 nM y que cuenta con actividad antitumoral *in vivo*. El anillo quinazolino hace puentes de hidrógeno con el sitio activo de la TS en su conformación cerrada y el grupo propargilo hace contactos hidrofóbicos que aumentan la afinidad del PDDF hacia la enzima (7). Aun cuando mostró buenas propiedades farmacológicas en evaluaciones toxicológicas en ratón, fue discontinuado en pruebas clínicas con humanos debido a que produjo toxicidad hepática y renal, debido a su baja solubilidad acuosa.

Otros antifolatos basados en el anillo quinazolino fueron sintetizados buscando aumentar su solubilidad. Entre ellos, Tomudex® (marca registrada de Zeneca, UK) tiene mayor solubilidad, aunque una menor constante de afinidad por la enzima (670 nM). Tomudex es un substrato de la enzima folil poliglutamato sintetasa *in vitro*, y su actividad biológica es potenciada por poliglutamilación (6). Tomudex es el único antifolato dirigido a TS aprobado para uso clínico en Europa y se encuentra en pruebas clínicas en Estados Unidos.

Otro antifolato con propiedades farmacológicas promisorias es el BW1843U89 (Burroughs Wellcome), inhibidor de la TS con buen índice terapéutico, y cuya toxicidad puede ser aliviada mediante su suplementación con folato. Estructuralmente el

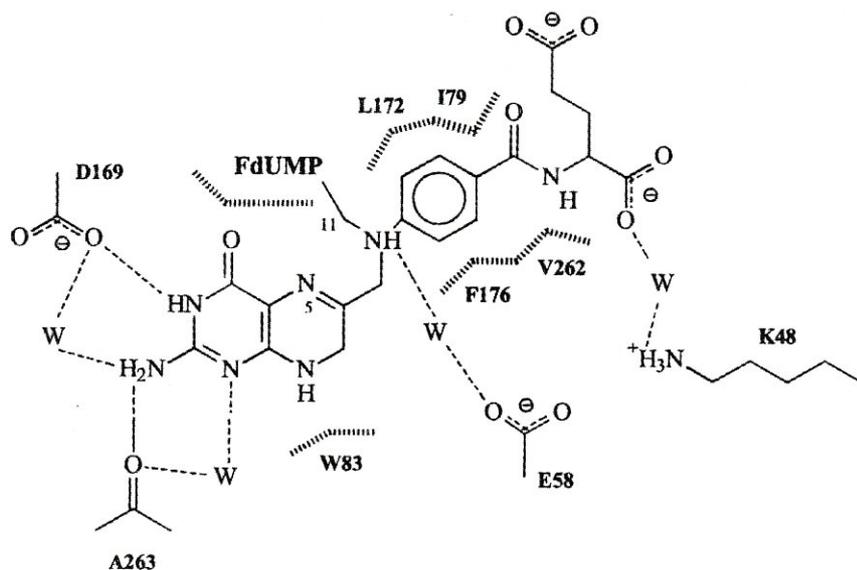


Figura 4. Representación de los contactos del sitio activo de la TS con el folato metil-tetrahidrofolato (MTF). Basado en la estructura del complejo ternario de la TS de *E. coli* con FdUMP y MTF (Hyatt et al, 1997). El anillo de cinco átomos del folato está abierto y forma enlaces covalentes con el FdUMP. Los puentes de hidrógeno están representados con líneas punteadas y los contactos de Van der Waals con líneas interrumpidas. Las moléculas de agua cristalográfica están representadas como "W".

BW1843U89 distorsiona el sitio activo de la TS y se une en una conformación completamente nueva, la cual no fue predicha por los algoritmos computacionales actuales para anclaje de ligandos (docking) utilizados en diseño de fármacos. En general se recomienda la determinación estructural de los complejos proteína-fármaco, ya sea por cristalografía o por espectroscopia de resonancia magnética nuclear, como parte del ciclo de diseño de fármacos, ya que los algoritmos computacionales usados en la modelación de estructura de proteínas y "docking" pueden ser incapaces de predecir interacciones importantes (8).

Gran parte del trabajo estructural mencionado en TS fue realizado utilizando a la enzima de *E. coli*, la cual es 50% idéntica con la de humanos. Sin embargo, la TS humana ha sido imposible de cristalizar en presencia de ligandos (9), por lo que era de gran prioridad la determinación de la estructura de una TS de mamíferos. Con este fin se determinó la estructura tridimensional de la TS de rata en complejo con dUMP y Tomudex (10), siendo ésta la primera oportunidad de explorar tanto el cambio conformacional como las interacciones enzima-fármaco en una TS 90% idéntica con la de humano.

Actividades de la TS de mamíferos

La TS de mamíferos tiene actividades no observadas en la enzima de organismos procariontes o eucariotes inferiores. Se ha observado que la expresión de TS es inducida por la presencia de 5-fluorouracilo, e inicialmente se propuso que la TS de mamíferos regula su propia expresión mediante la unión de su propio ARN mensajero de manera similar a la regulación de la expresión de ferritina a través de la aconitasa y del elemento de respuesta al hierro. Sin embargo, datos recientes sugieren que esta regulación de la expresión de la TS es mediada por degradación de la proteína y no por estabilidad del mensajero.

Se han propuesto otros tipos de regulación de la actividad celular de la TS, mediante fosforilación y compartimentalización entre el citosol y el núcleo. Una vez localizada la TS en el núcleo, se ha sugerido que esta forma parte del complejo de replicación del ADN o 'replisoma'.

Aplicaciones biotecnológicas

Existe un gran interés de aplicar el conocimiento básico del mecanismo de catálisis e inhibición mediante antifolatos en terapias genéticas. Estudios *in vitro* han mostrado la posibilidad de producir células progenitoras de médula humana transformadas con un gen de TS resistente a antifolatos (11). Estas células mutantes son capaces de crecer en elevadas concentraciones de antifolato y continuar produciendo suficiente dTMP para mantener el requerimiento celular. Se propone transplantar estas células transformadas de regreso al paciente canceroso con el fin de aumentar su tolerancia a altas concentraciones del fármaco sin verse inmunocomprometido por daño a leucocitos.

El diseño de nuevos fármacos, principalmente el de antibióticos tiene aún mucho futuro. En particular,

aun cuando los avances en métodos computacionales para predecir la interacción ligando-proteína han mejorado significativamente, no han logrado sustituir la determinación estructural del complejo, debido a la complejidad de modelar dichas interacciones (8). El hallazgo de que la fenolftaleína inhibe a la TS ha dado pie a la búsqueda de derivados de ese compuesto con actividad antibiótica (12). Es claro que los estudios estructurales y mecanísticos son de gran utilidad en múltiples aplicaciones biotecnológicas, siendo el estudio de la estructura y función de la TS un claro ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

R.R.S. agradece el apoyo de CONACYT. (Fondo para Retener y Repatriar a los Investigadores Mexicanos Exp. 990401) y CIAD, A.C. (Proy. DTAOA 6541-0). También se agradece al M.C. Fernando Hernández Terán, M.C. Alma Beatriz Peregrino y al Dr. Francisco Vargas Albores su colaboración en la revisión editorial de este artículo.

REFERENCIAS

1. Carreras, C. W. and D. V. Santi (1995). "The Catalytic Mechanism and Structure of Thymidylate Synthase." *Ann. Rev. Biochem.* 64: 721-762.
2. Hardy, L. W., J. S. Finer-Moore, et al. (1987). "Atomic Structure of Thymidylate Synthase: Target for Rational Drug Design." *Science* 235: 448-455.
3. Mathews, C. K. and K. E. Van Holde (1996). *Biochemistry*. Menlo Park, The Benjamins/Cummings Publishing Co., Inc.
4. Bertino, J. R. (1997). "Chemotherapy of colorectal cancer: history and new themes." *Semin Oncol* 24 (5 Suppl 18): S18-3-S18-7.
5. Kamen, B. (1997). "Folate and antifolate pharmacology." *Semin Oncol* 24(5 Suppl 18): S18-30-S18-39.
6. Jackman, A. L., F. T. Boyle, et al. (1996). "Tomudex (ZD1694): from concept to care, a programme in rational drug discovery." *Invest New Drugs* 14(3): 305-16.
7. Montfort, W. R., K. M. Perry, et al. (1990). "Structure, Multiple Site Binding, and Segmental Accommodation in Thymidylate Synthase on Binding dUMP and an Anti-Folate." *Biochemistry* 29(30): 6964-6977.
8. Verlinde, C. L. and W. G. Hol (1994). "Structure-based drug design: progress, results and challenges." *Structure* 2: 577-587.
9. Schiffer, C. A., I. J. Clifton, et al. (1995). "Crystal Structure of Human Thymidylate Synthase: A Structural Mechanism for Guiding Substrates into the Active Site." *Biochemistry* 34: 16279-16287.
10. Sotelo-Mundo, R. R., J. Ciesla, et al. (1999). "Crystal Structures of Rat Thymidylate Synthase Inhibited by Tomudex, a Potent Anticancer Drug." *Biochemistry* 38: 1087-1094.
11. Tong, Y., X. Liu-Chen, et al. (1998). "Isolation and characterization of thymitaq (AG337) and 5-fluoro-2-deoxyuridylate-resistant mutants of human thymidylate synthase from ethyl methanesulfonate-exposed human sarcoma HT1080 cells." *J Biol Chem* 273(19): 11611-8.
12. Shoichet, B. K., R. M. Stroud, et al. (1993). "Structure-Based Discovery of Inhibitors of Thymidylate Synthase." *Science* 259: 1445-1450.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Fermín Pacheco Moisés y Rafael Moreno Sánchez

TEMA: Cinética enzimática. Activación no esencial.

La actividad hidrolítica de la ATP sintetasa de la bacteria *Paracoccus denitrificans* se incrementa por oxianiones tales como el sulfito, el bicarbonato, el arsenato y el fosfato (Pacheco-Moisés et al., 2000). Con la finalidad de caracterizar el efecto activador

del sulfito, se cuantificó la hidrólisis de ATP a 40°C, mediante la liberación del fosfato, en vesículas invertidas obtenidas de esta bacteria.

Las velocidades iniciales de hidrólisis de ATP en función de la concentración de sustrato (ATP-Mg) a concentraciones fijas de sulfito (0 - 60 mM) son las siguientes:

ATP-Mg (mM)	ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP (nmol min ⁻¹ (mg proteína) ⁻¹)					
	sulfito (mM)					
	0	2.5	10	20	40	60
0.225	32	101	131	143	151	155
0.375	49	151	177	189	165	187
0.6	54	163	211	236	256	223
1	69	231	291	342	370	380
1.5	80	216	319	365	459	488
3	71	222	314	379	479	475

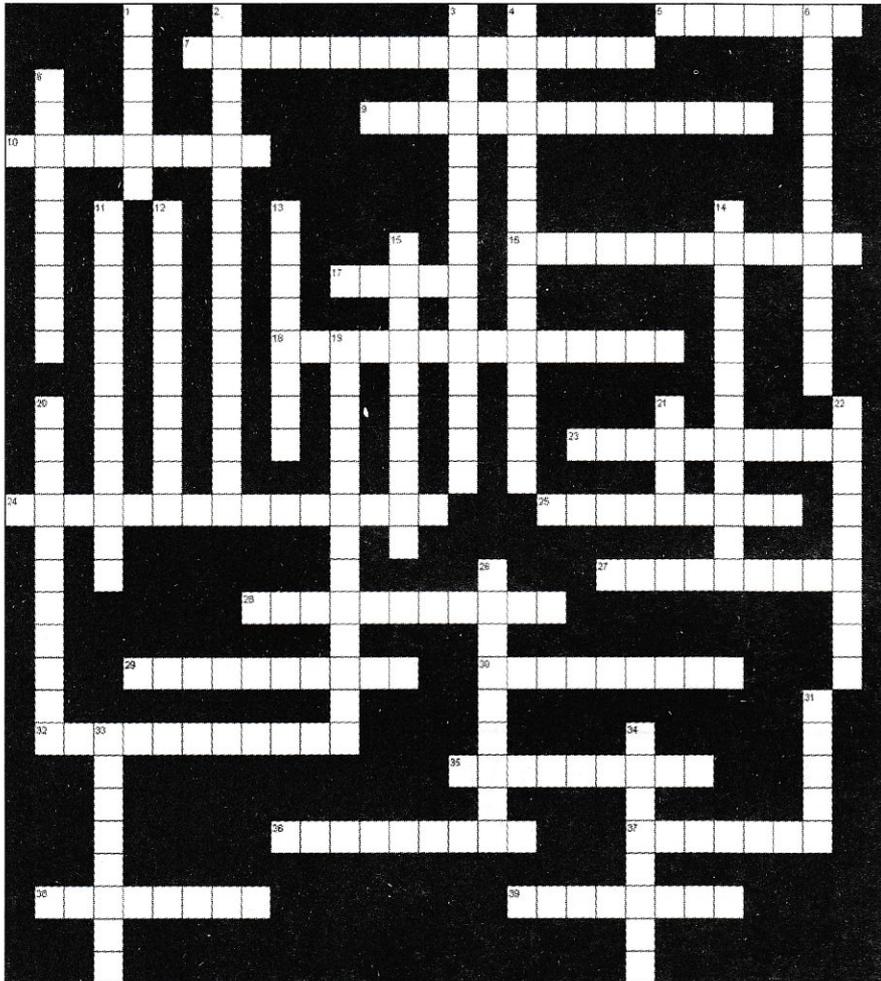
De acuerdo con el esquema general para la activación no esencial, determinar el valor de: 1) K_s (constante de disociación del complejo enzima-ATP) y V_{max} (velocidad máxima); 2) α (factor que

modifica la K_s cuando el activador se une a la enzima; 3) β (factor que modifica la velocidad máxima) y 4) la constante de activación por sulfito (K_A).

CRUCIBIOQ

RADICALES LIBRES

Yolanda Saldaña Balmori



HORIZONTALES

- 5 El llamado libre, es una especie química (atómica o molecular) con uno o más electrones desapareados.
- 7 Proceso iniciado por una especie reactiva que abstrae un hidrógeno a un ácido graso poliinsaturado.
- 9 Enzima que permite que el araquidonato y oxígeno molecular den prostaglandinas.
- 10 Ácido vitamínico, participa con prolina y lisina hidroxilasas en la biosíntesis de la colágena.
- 16 Tóxico, primer producto de la oxidación del etanol.
- 17 Ácido derivado de purinas, altamente oxidado, detoxifica de nitrógeno al organismo.
- 18 Enzimas que catalizan la incorporación del oxígeno al araquidonato y producen leucotrienos.
- 23 Ruptura de una unión covalente, cada componente se lleva un electrón generando radicales libres.

- 24 Ácidos grasos participantes de los fosfolípidos, iniciadores de la lipoperoxidación.
- 25 Glutamilcisteinilglicina, reducido participa en la destrucción de peróxido de hidrógeno.
- 27 Pérdida de electrones de un átomo o molécula.
- 28 Proceso acoplado a la isquemia, al regresar el oxígeno genera radicales libres.
- 29 Producto de la adición de un electrón al oxígeno molecular.
- 30 Ganancia de electrones ya sea en átomos o moléculas.
- 32 Radical libre, se produce por la oxidación de la hidroquinona, hay pérdida de un hidrógeno.
- 35 Hay dos, uno se produce porque un electrón del oxígeno cambia de espín.
- 36 Vitamina, con anillo aromático que puede oxidarse-reducirse. Radical libre estable.

- 37 Molécula diatómica, birradical, el principal promotor de radicales libres en la célula.
- 38 Enzimas que utilizan oxígeno molecular para oxidar simultáneamente a un sustrato y a un cosustrato.
- 39 Oxidación de ácidos grasos insaturados; otorga sabor desagradable a los alimentos.

VERTICALES

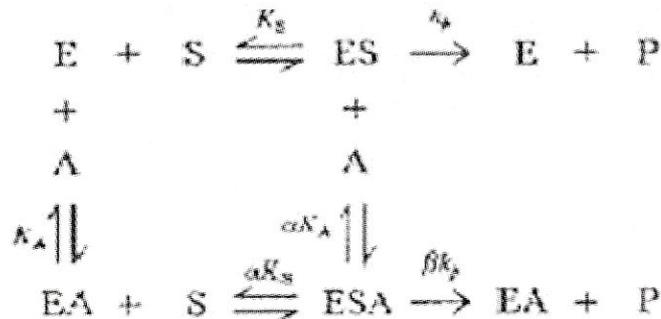
- 1 Metal de transición, la deficiencia en humanos ocasiona anemia, presente en hemoglobina y citocromos.
- 2 Enzima que reduce la mayor parte del oxígeno en los seres vivos.
- 3 Peroxidasa de los neutrófilos, produce HClO con función bactericida.
- 4 Uno de los productos terminales de la peroxidación de los lípidos, al exponerse a altas temperaturas.
- 6 Agente que cataliza la remoción de radicales libres, ejemplo: catalasa, dismutasas, glutatión.
- 8 Enzima que remueve al radical libre superóxido, puede tener Cu/Zn, Mn o Fe.
- 11 Estructura química en donde los momentos magnéticos de un par electrónico son opuestos y se anulan.
- 12 Son metales con electrones desapareados, pueden cambiar su número de oxidación, ejemplo: Fe, Cu.
- 13 Enzima que en peroxisomas, transforma 2 moléculas de agua oxigenada en 2 de agua y una de oxígeno.
- 14 Ruptura de una unión covalente, los dos electrones se quedan en un componente originando iones.
- 15 Proteínas con hierro, transportan electrones en respiración mitocondrial y fotosíntesis.
- 19 Característica de los radicales libres, el momento magnético de un electrón está descompensado.
- 20 Enzimas que reducen al agua oxigenada cuando sustancias como el glutatión donan electrones.
- 21 Enfermedad en la que hay depósito de cristales de urato en articulaciones ocasionando inflamación.
- 22 Metal esencial en los animales, forma parte de la superóxido dismutasa mitocondrial.
- 26 Radical libre del oxígeno, altamente reactivo.
- 31 Protector de las radiaciones solares, producido por la fotodisociación del oxígeno.
- 33 Cambio hereditario en la secuencia de nucleótidos del DNA, puede producirse por daño oxidativo.
- 34 El de hidrógeno, es el producto de la reducción del oxígeno con 2 electrones y 2 protones.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

RESPUESTA:

De acuerdo con el mecanismo enzimático que describe la activación no esencial (esquema 1) se deducen las siguientes ecuaciones: 1) de velocidad en la forma

de Michaelis-Menten; 2) de velocidad máxima aparente y K_s aparente a una concentración fija de activador; 3) la ecuación de los dobles recíprocos y 4) las ecuaciones de los regráficos secundarios (Segel, 1975).



Esquema 1

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[S]}{K_S \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)} + [S] \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}} \dots\dots(1)$$

Ecuación de velocidad para un activador no esencial

$$V_{m_{app}} = \frac{V_m \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \dots\dots(2) \qquad K_{S_{app}} = K_S \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \dots\dots(3)$$

Ecuación de velocidad máxima aparente y K_s aparente a una concentración fija de activador.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_S}{V_m} \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right) [S]} + \frac{1}{V_m} \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)} \dots\dots(4)$$

Ecuación de dobles recíprocos para un activador no esencial

$$\frac{1}{\Delta m} = \frac{\alpha K_A V_m}{K_S (\beta - \alpha)} \frac{1}{[A]} + \frac{\beta V_m}{K_S (\beta - \alpha)} \dots\dots(5)$$

Ecuación para el gráfico secundario de las pendientes

$$\frac{1}{\Delta \text{intcp}} = \frac{\alpha K_A V_m}{(\beta - 1)} \frac{1}{[A]} + \frac{\beta V_m}{(\beta - 1)} \dots\dots(6)$$

Ecuación para el gráfico secundario de los interceptos.

Se grafica la familia de curvas correspondientes a los inversos de la velocidad de hidrólisis contra los inversos de la concentración de sustrato, para cada una de las concentraciones de sulfito. De acuerdo con la ecuación 4, la Fig. 1 muestra que en la presencia de

activador saturante (sulfito = 60 mM), los interceptos en el eje de las abscisas y en el de las ordenadas permiten calcular βV_m y αK_S , respectivamente. Mientras que sin activador (sulfito = 0) se pueden calcular V_m y K_S . El cruce de las curvas en el tercer cuadrante indica que el valor de α será mayor a 1 (Segel, 1975).

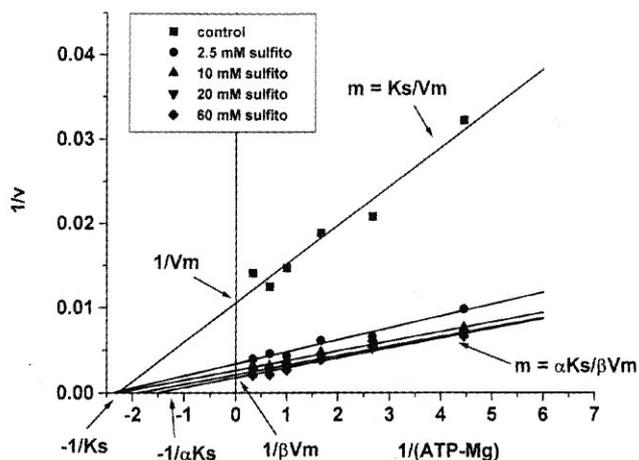


Figura 1.

Se observa que el sulfito es un activador no esencial que disminuye la afinidad por ATP 1.79 veces ($K_S = 0.44$ mM en el control y 0.79 mM con sulfito saturante) y aumenta la velocidad máxima 6.44 veces ($90 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ en el control y $580 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ con sulfito saturante). En consecuencia, los valores de α y β son 1.79 ($0.79/0.44$) y 6.44 ($580/90$), respectivamente.

Para determinar la constante de activación, se utilizan las gráficas secundarias de los recíprocos, usando las pendientes y los interceptos de las curvas de la Fig. 1 y las ecuaciones 5 y 6. Sin embargo, como se muestra en la Fig. 2, los datos experimentales no se

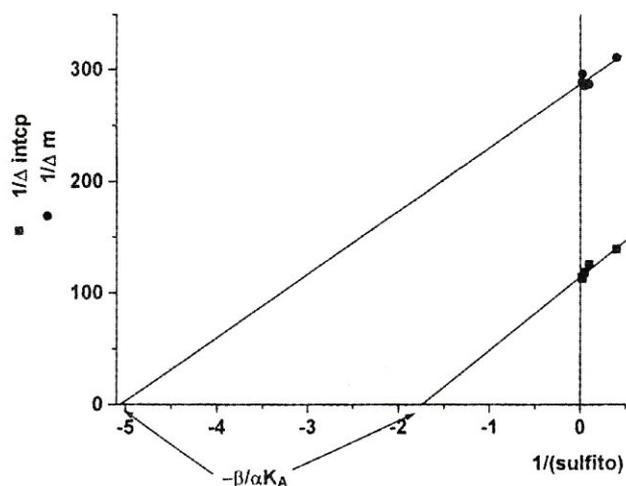


Figura 2.

ajustan perfectamente al modelo propuesto, pues las curvas obtenidas no se interceptan en un punto común en las abscisas y a altas concentraciones de sulfito las curvas tienden a ser paralelas. Esto conduce a que se obtengan dos valores diferentes de la constante de activación, los cuales son: 0.63 y 1.84 mM, cuando se calculan a partir de las pendientes y los interceptos, respectivamente. Sin embargo, son valores semejantes. Como se observa en la Fig. 1, con 2.5 mM de sulfito, la pendiente de la curva disminuyó 3.2 veces con respecto a la curva obtenida en ausencia de sulfito, por lo que el valor de la K_A debe ser menor a 2.5 mM. Es probable que el valor de la K_A calculado a partir de los interceptos esté sobrestimado, pues las curvas obtenidas con 10 mM de sulfito o más son casi paralelas.

Las inconsistencias del ajuste de los datos experimentales al esquema 1 pueden deberse a que el sulfito aumenta la hidrólisis de ATP mediante dos vías (Pacheco-Moisés *et al.*, 2000): 1) un efecto directo al unirse a la enzima, lo que favorece la disociación del inhibidor ADP-Mg, que se encuentra fuertemente pegado en uno de los sitios catalíticos; y 2) un efecto indirecto, relacionado con el aumento en el gradiente de pH transmembranal inducido por la activación de la hidrólisis de ATP. A este respecto, hemos muestra-

do que el efecto máximo del sulfito en el aumento en el gradiente de pH se alcanza a una concentración de 8 mM. Un aumento en el gradiente de pH activa también la actividad hidrolítica. Se ha sugerido que el gradiente de pH no afecta la afinidad por los nucleótidos, en particular del ADP-Mg. Por lo tanto, el sulfito activa la hidrólisis al actuar parcialmente como un desinhibidor.

Otro método para estimar la constante de activación, es graficar el inverso de las actividades enzimáticas en presencia de activador menos la actividad basal contra el inverso de la concentración de activador (Segel, 1975) (Fig. 3). En este caso los datos a

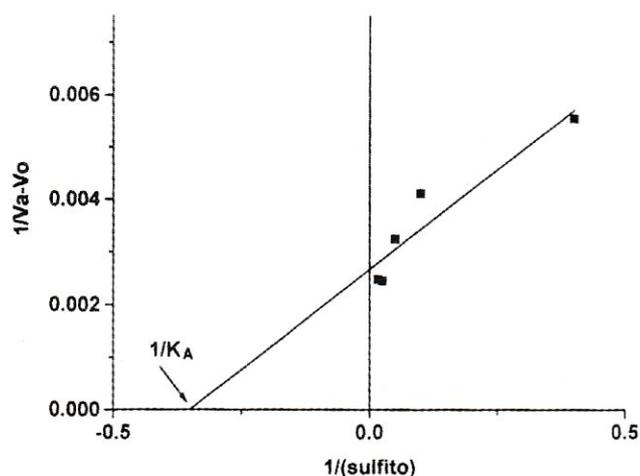


Figura 3.

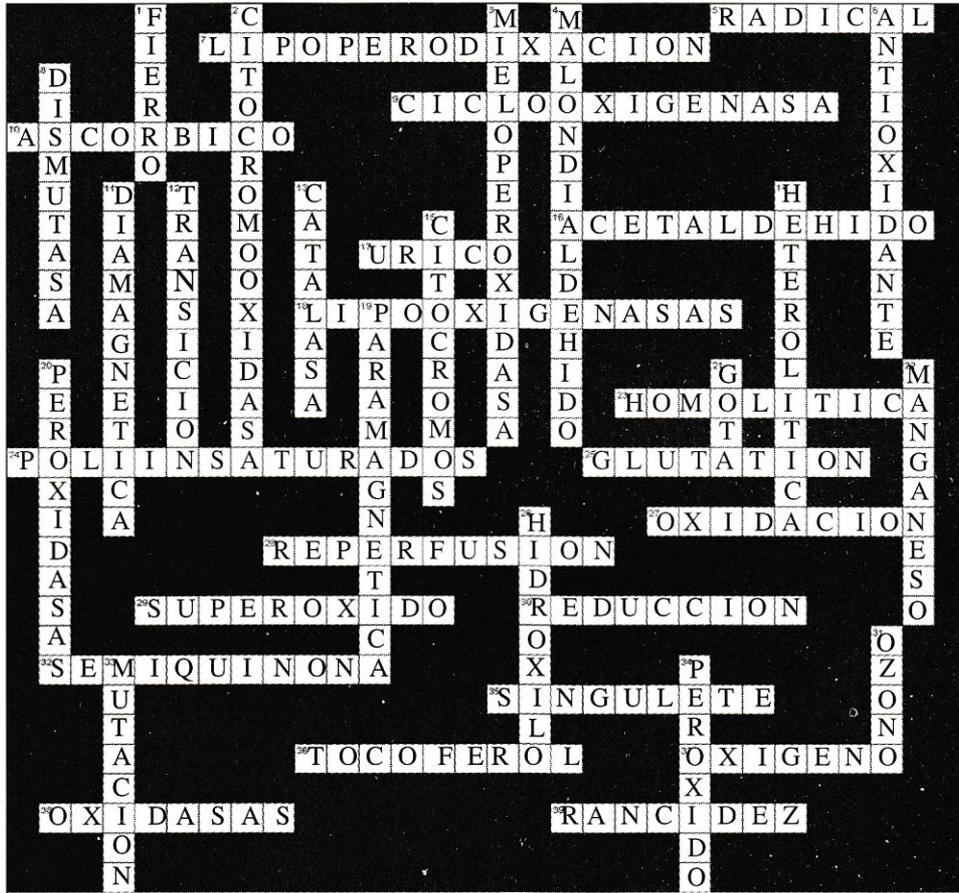
graficar son los obtenidos a una concentración saturante de sustrato. El valor calculado para la constante de activación es 2.85 mM, valor semejante a los obtenidos de los regráficos secundarios.

REFERENCIAS

1. Segel IH (1975) Enzyme kinetics. John Wiley and Sons, New York. Cap. 5. pp 227-231.
2. Pacheco-Moisés F, García JJ, Rodríguez-Zavala JS & Moreno-Sánchez R (2000) Sulfite and membrane energization induce two different active states of the Paracoccus denitrificans FoF1-ATPase. Eur J of Biochem 267: 993-1000.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ

RADICALES LIBRES



SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2001
XXVIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
IX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.
Semana del 1 al 5 de octubre de 2001, programa preliminar

HORA	LUNES 1	MARTES 2	MIÉRCOLES 3	JUEVES 4	VIERNES 5
8:00	Inscripción				
9:00 a 10:30	Avances y retrocesos en el estudio del origen de la vida. Antonio Lazcano Facultad de Ciencias, UNAM.	Ruta secretoria de <i>Entamoeba histolytica</i> Alejandro Alagón Instituto de Biotecnología, UNAM.	Transporte intracelular de proteínas. José Moreno CMN Siglo XXI, IMSS.	<i>E. coli</i> patógena causante de enfermedad intestinal. Alejandro Cravioto y Carlos Eslava Facultad de Medicina, UNAM.	Estrategias de Docencia. Rogelio Lozano Facultad de Medicina, UNAM.
RECESO					
10:45 a 12:15	Genes y genomas. Víctor Valdés Facultad de Ciencias, UNAM.	Fisiología celular y molecular de canales iónicos. Marcelino Cerejido Cinvestav, IPN.	Mecanismos de regulación de transcripción por hormonas esteroideas. Antonio Cerbón y Adriana Mendoza Facultad de Química, UNAM.	Metaloproteinasas de matriz extracelular, un delicado equilibrio... Annie Pardo. Facultad de Ciencias, UNAM. Moisés Selman, INER	Estrategias de Docencia Enrique Martínez ITESM Campus Monterrey
RECESO					
12:30 a 14:00	Microbiología genómica computacional. Julio Collado y Gabriel Moreno Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno-UNAM	Mitocondria y Apoptosis Mauricio Montal Universidad de California La Jolla, CA, USA	Alteraciones bioquímicas relacionadas con el Alzheimer Clorinda Arias Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM	Aspectos genéticos de la diabetes en México. Teresa Tusié Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM-INP	Estrategias de Docencia Irma Delfin y Ma. Isabel Raygoza UAM Azcapotzalco
	RECESO				
16:00 a 19:00	Carteles Congreso de la AMPB, A.C.	TALLER: LA CONSTRUCCIÓN DE MATERIAL DIDÁCTICO HIPERTEXTUAL COMO HERRAMIENTA DE APOYO AL PROCESO DE ENSEÑANZA-APRENDIZAJE Jorge Joel Reyes Méndez. UAM-Xochimilco			Sesión de Negocios de la AMPB, A.C. Clausura

ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.

IX CONGRESO (1 de octubre de 2001)

SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2001 (1 al 5 de octubre de 2001)
Facultad de Medicina, U.N.A.M. Ciudad Universitaria, México.

OBJETIVO:

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

PARTICIPANTES: Se invita a profesores, instructores de laboratorio y estudiantes de bioquímica y áreas afines, de diferentes carreras de licenciatura y posgrado del país, así como a investigadores de distintas áreas interesados en la enseñanza. Se aceptará un máximo de dos trabajos por ponente.

TEMAS:

Las presentaciones deberán ser incluidas dentro de los siguientes temas:

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

Los resúmenes deberán ser escritos con letra Times New Roman de 10-12 puntos, con una extensión máxima de una hoja cuartilla, a espacio sencillo y con 2.5 cm de margen por lado. Se deberá

especificar: título (A MAYÚSCULAS), autores y adscripción, introducción, objetivo, hipótesis y/o justificación, métodos y/o técnicas empleadas, resultados y conclusiones. El resumen podrá tener un esquema, figura o tabla. Le pedimos cuidar su presentación y ortografía, pues los resúmenes serán publicados en las memorias que se elaborarán en ocasión del IX Congreso tal y como se envíen. El original de su trabajo, el cual no deberá tener borrones ni tachaduras, se enviará sin doblar, junto con tres copias por correo postal. No se aceptan envíos por Fax. Se sugiere que la presentación del resumen se apegue al siguiente ejemplo:

INFLUENCIA DE LA EDUCACIÓN MEDIA SUPERIOR SOBRE EL ÍNDICE DE APROBACIÓN DEL CURSO DE BIOQUÍMICA. (renglón libre)

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

RESUMEN...

Favor de enviar hoja de registro, originales del resumen y tres copias de cada uno de ellos a la Sra. Marivel Rojas García, Apartado Postal 70-281, Código postal 04510, México, D. F. Inscripción: \$400.00 M.N. antes del 20 de julio y \$500.00 M.N. después de esta fecha. Se puede pagar en las instalaciones de la Facultad Medicina, o si gusta, por giro postal a nombre del Lic. Armando Barbosa, Departamento de Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM, A.P. 70-159, México, D. F., C.P. 04510 y enviar la copia del mismo por fax con atención a la Sra. Marivel Rojas García al (5)616-2419.

Fecha límite para la entrega de resúmenes: **30 de agosto de 2001.**

ORGANIZADORES:

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza.

Correo Electrónico: majo@servidor.unam.mx
y majo@bq.unam.mx

M. en C. Patricia V. Torres Durán.

Correo Electrónico: pati@bq.unam.mx

M. en C. Alicia Cea Bonilla

Correo Electrónico:
aliciac@servidor.unam.mx y
*acea@bq.unam.mx

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Apartado Postal 70-159, 04510 México, D. F.

Teléfono: (5)623-2169 y (5)623-2178 y Fax: (5)616-2419

INFORMES:

Marivel Rojas García, Correo Electrónico: beb@bq.unam.mx

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Apartado Postal 70-281, 04510 México, D. F., Teléfono: (5)623-2170, Fax: (5)616-2419. <http://una.fmedic.unam.mx>

IX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.

FORMA DE REGISTRO

DATOS PERSONALES

NOMBRE(S) _____ APELLIDOS _____

MIEMBRO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA:

SI

NO

NOMBRAMIENTO

TIEMPO COMPLETO _____

MEDIO TIEMPO _____

POR HORAS _____

CARRERA EN LA QUE IMPARTE BIOQUÍMICA O MATERIA AFÍN _____

ADSCRIPCIÓN

UNIVERSIDAD _____

FACULTAD O ESCUELA _____ DEPARTAMENTO _____

DIRECCIÓN

CALLE Y NÚMERO _____

COLONIA _____ CIUDAD _____

ENTIDAD FEDERATIVA _____ CÓDIGO POSTAL (Apartado Postal) _____

TELÉFONO: _____ FAX: _____

CORREO ELECTRÓNICO: _____

TRABAJOS ENVIADOS AL CONGRESO

NÚMERO DE RESÚMENES ENVIADOS: _____

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

_____ Aplicación de sistemas de enseñanza mediada por computadora

_____ Efectividad de diferentes sistemas de evaluación

_____ Estudios poblacionales sobre índices de aprobación y/o deserción

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

_____ Instrumentación y/o innovación de prácticas de laboratorio

_____ OTROS: _____

XII CONGRESO DE BIOENERGETICA Y BIOMEMBRANAS

2o. Comunicado

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA

SEDE: Hotel Real de Minas Querétaro, Qro. del 18 al 22 de noviembre de 2001

Información sobre Cuotas e Inscripciones

Tarifas vigentes hasta el 15 de agosto

Paquete alimentos + Habitación (ocupación doble).....	\$2,700.00
Paquete alimentos + Habitación (ocupación sencilla).....	\$4,200.00
Inscripción estudiantes*.....	\$ 600.00
Inscripción investigadores.....	\$ 800.00

* Los estudiantes que presenten trabajo como primer autor no pagarán inscripción.

1.- El costo de los paquetes incluye: habitación por cuatro noches en ocupación sencilla o doble; cena del domingo, desayunos y comidas de lunes a jueves. Las cenas del lunes a miércoles correrán por cuenta de los asistentes; así quedarán en libertad de explorar la ciudad y su cocina típica.

2.- Indicar al pagar su cuota, con quien desearía compartir la habitación. Los acompañantes pagarán el mismo costo del paquete de habitación más alimentos y no tendrán derecho a la utilería del congreso a menos que paguen el costo de inscripción (\$600.00 M.N.).

3.- Después del 15 de agosto, el paquete de habitación más alimentos quedará sujeto a la disponibilidad del hotel y costos del momento.

4.- De existir cancelación antes del 30 de octubre solo se reintegrará el 50% del pago. A partir del 1º de noviembre no se aceptarán cancelaciones.

Las instrucciones para la elaboración de resúmenes, así como las formas de pago y de registro aparecerán próximamente en la página de la SMB: <http://ifcsun1.ifisiol.unam.mx/smb/>.

Para mayores informes, comunicarse con:

Dra. Ana Cecilia Zazueta
Tel. 5573-2911 (1298)/FAX 5573-0926
e-mail: zazueta22@hotmail.com

Dr. Mauricio Díaz
Tel. y FAX 5623-4035
e-mail: mdiaz@calli.cnb.unam.mx

Dr. Sergio Sánchez-Armass
Tel. (48) 26-2345/FAX (48) 17-6976
e-mail: armass@uaslp.mx

Sra. Virginia Godínez
Tel. 5622-5760/ FAX 5622-5630
e-mail: sgenmol@ifisiol.unam.mx



Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

CONVOCATORIA

*Investigadores
Estudiantes*

!Envíen sus contribuciones científicas a

TIP REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

para su publicación!

TIP

REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM es una publicación periódica y con arbitraje que difunde información científica sobre temas de botánica y zoología; ecología; microbiología; bioquímica; fisicoquímica; física; matemáticas; farmacia; química general, orgánica e inorgánica.

La revista es un foro para recibir trabajos de carácter interdisciplinario escrito por investigadores científicos, pero también pretende cubrir un espacio como es el publicar los resultados de investigaciones de tesis de estudiantes de grado, debidamente asesorados, de cualquier institución, tanto nacional como internacional.

Se aceptan trabajos de investigación científica original e inédita, artículos breves, artículos de revisión, ensayos y notas científicas en español e inglés.

Las personas interesadas en la publicación de sus trabajos de investigación o que soliciten información complementaria, deberán dirigirse a:

PROGRAMA EDITORIAL

División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Batalla del 5 de Mayo, esq. Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, C.P. 09230. Tel. y fax: 57.73.63.32; e-mail: revistatip@yahoo.com; terrones@fenix.ifisicacu.unam.mx (**DR. HUMBERTO TERRONES, EDITOR**).

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 de 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 tu 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

EIBEB 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 revisen algunos de los últimos números de esta publicación para que vean estilo, tipos de abreviaturas, etc., así como que se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 1) El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en los procesadores de textos "Winword" o "Word-perfect", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Éste deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo y de la solicitud para su publicación, firmada por cada uno de los autores.
- 2) El trabajo debe iniciarse con el título del artículo, nombre de los autores, iniciando por nombre propio completo, y marcando 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. 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 KJ (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The molecular biology of immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Wiley 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. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá dársele el crédito correspondiente u obtener el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse así (Fig. X) numerándolas con arábigos. Las tablas siempre llevarán la inicial a mayúscula y se numerarán con romanos.

- 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, comentarios o erratas de artículos publicados previamente, etcétera.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica en el inciso I-1.
- 4) Se aceptará un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto según el inciso I-4. En caso de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla, de acuerdo con las características que se indican en el inciso I-5.

Los manuscritos serán leídos por tres revisores en un lapso no mayor de dos meses. 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 correspondiente del BEB en su localidad.

CONTENIDO

EDITORIAL

LA BIOENERGÉTICA DEL SIGLO XXI
Rafael Moreno Sánchez 70

ARTÍCULOS

LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES Y
LA COMPLEJIDAD DE LOS SISTEMAS
BIOLÓGICOS
Juan Carlos Raya Pérez 72

EL ENDOTELIO VASCULAR Y LA
DISFUNCIÓN ENDOTELIAL
Nayade Pereira Roche 79

LA ATP SINTETASA
Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y
Guadalupe Guerra 85

EL COMPLEJO I DE LA CADENA
RESPIRATORIA Y LOS FACTORES QUE
DETERMINAN LA VELOCIDAD DE LA
TRANSFERENCIA DE LOS ELECTRONES
Juan Pablo Pardo, Federico Martínez,
Isabel Velázquez y Óscar Flores-Herrera 93

EL COMPLEJO II: LA SUCCINATO
DESHIDROGENASA DE LA CADENA
RESPIRATORIA
Juan Pablo Pardo, Federico Martínez,
Guadalupe Guerra e Isabel Velázquez 103

ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA
TIMIDILATO SINTETASA EN EL DISEÑO
DE FÁRMACOS ANTICÁNCER
Rogerio R. Sotelo-Mundo 108

OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA
ENZIMÁTICA. ACTIVACIÓN NO ESENCIAL
Fermín Pacheco Moisés y
Rafael Moreno Sánchez 114

CRUCIBIOQ.
RADICALES LIBRES
Yolanda Saldaña Balmori 115

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Fermín Pacheco Moisés y
Rafael Moreno Sánchez 116

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori 119

CONVOCATORIAS

SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA
Segundo anuncio 120

IX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN
MEXICANA DE PROFESORES DE
BIOQUÍMICA, A. C.
Primer comunicado 121

XII CONGRESO DE BIOENERGÉTICA Y
BIOMEMBRANAS
Segundo comunicado 123

TIP REVISTA ESPECIALIZADA EN
CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS.
FES-ZARAGOZA
Convocatoria 124

CORRESPONSALES DEL BOLETÍN
DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 125

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DEL BOLETÍN
DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 126