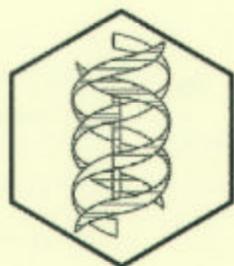


REB 2003

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la
**Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, AC**

Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina
UNAM



Facultad de Medicina,
UNAM



Sociedad Mexicana de
Bioquímica, AC

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

VOL. 22

No. 1

MARZO 2003

COMITÉ EDITORIAL

EDITORES FUNDADORES

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias e
Instituto Politécnico Nacional

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

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

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

EDITORES

CARLOS CERVANTES VEGA
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

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

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

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
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

EVA IRMA VEJAR RIVERA
Facultad de Química
Universidad de Sonora

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.

MARÍA DEL CARMEN RÍOS DE MOLINA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires, Argentina

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).

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), 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: 12000; Licitud de Contenido: 8397 No. de expediente 1/432"2"/15792; Reserva al título en derecho de autor No. 04-2002-030616225500- 102. Diseño: Juan Antonio Flores de la Torre; Producción: Francisco Urtecho Ulloa. Impresa en los talleres Grupo Jolmaf, S.A. de C.V., Hopelchen, Manzana 16 Lote 43, Col. Héroes de Padierna, México, DF; tiraje 1,500 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.

REB 2003 Vol 22 Núm 1 Marzo de 2003

CONTENIDO**COMITÉ EDITORIAL****EDITORIAL**

- 50 AÑOS DEL MODELO DEL ADN PROPUESTO
POR WATSON Y CRICK: UN BREVE ARTÍCULO
CON GRANDES EFECTOS
Luis Alfonso Vaca Domínguez y Alejandro Zentella Dehesa..... 1

ARTÍCULOS

- EL PAPEL DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN
LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS
Lilian González-Segura¹ y Rosario A. Muñoz-Clares..... 3

- ESTRUCTURA, CINÉTICA Y PAPEL DE LA PIRUVATO
FOSFATO DICINASA: UNA ENZIMA BLANCO PARA
EL DISEÑO DE FÁRMACOS Y CLAVE EN LA
FOTOSÍNTESIS C₄
Marcela Lilián Varela Gómez..... 11

- EN BUSCA DE NUEVOS FÁRMACOS CONTRA
ALGUNOS TRIPANOSOMÁTIDOS
Gloria Hernández-Alcántara 19

- EL PLEGAMIENTO DE LOS PRIONES
Oscar Flores-Herrera, Federico Martínez y Juan Pablo Pardo. 25

OTRAS COMUNICACIONES

- PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA.
INHIBICIÓN POR SUSTRATO
Rafael Moreno Sánchez y Emma Saavedra 35

- CRUCIBIOQ. METABOLISMO DEL COLESTEROL
Yolanda Saldaña Balmori 36

- RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Rafael Moreno Sánchez y Emma Saavedra 38

- SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori 39

- DIEZ AÑOS DE LA MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERI-
MENTAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD
MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Salvador Uribe Carvajal..... 40

CONVOCATORIAS

- SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2003..... 42

- XXX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA,
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD
DE MEDICINA, U. N. A. M..... 43

- XI CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA
DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A. C. 44

- ACTUALIZACIÓN DE DATOS DE
LOS SUSCRIPTORES 47

- CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 48

- INTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES
DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 49**

EDITORIAL

50 AÑOS DEL MODELO DEL ADN PROPUESTO POR WATSON Y CRICK: UN BREVE ARTÍCULO CON GRANDES EFECTOS

El 25 de Abril de 1953 apareció en la revista *Nature* un artículo altamente especulativo intitulado “Molecular structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid”. El texto que ocupaba apenas un poco más de una página iniciaba con las siguientes palabras: “We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features, which are of considerable biological interest.”

Con este trabajo, dos advenedizos al campo de estudios estructurales, James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick corregían el modelo originalmente propuesto por Pauling y Corey, y daban inicio así una de las revoluciones más sorprendentes en ciencia.

En ese año Watson, un joven estadounidense, contaba con 23 años y Crick, un inglés, tenía 33 años, y trabajaban en el afamado Laboratorio Cavendish de la Universidad de Cambridge. Este aparente breve artículo nos recuerda la famosa frase de Neil Armstrong al poner pie sobre la superficie lunar por primera vez en la historia de la humanidad: “a small step for man, a giant leap for mankind”. Los estudios que llevaron al aislamiento del ADN, su identificación sobre el material genético y a comprender su estructura, llevaron más de 70 años y requirieron de la participación de mentes brillantes.

El ADN fue aislado por vez primera por Friederich Miescher en 1869, y su importancia como la molécula portadora de la información hereditaria quedó demostrada en 1952 por los estudios de Alfred Hershey y Martha Chase, apoyados en los antecedentes primero de Frederick Griffith en 1928 y posteriormente por Oswald Avery, C. M. MacLeod y Macklin McCarty en 1944.

25 años después, en 1953 Watson y Crick publicaron la estructura que hoy conocemos como ADN en su

conformación B. Al igual que muchos otros grandes descubrimientos, el trabajo de Watson y Crick constituye la cristalización de varias ideas, modelos y evidencias experimentales generadas a lo largo de muchas décadas. En este caso Watson y Crick se apoyaron en la recientemente establecida teoría de los enlaces químicos postulada por Linus Pauling y en los datos de difracción de rayos X generados por Maurice Wilkins y Rosalind Franklin. La ventaja de Watson y Crick fue que traían nuevas ideas y no estaban atados a los dogmas y prejuicios de Pauling y de Wilkins. Gran parte de nuestro actual entendimiento acerca de los sofisticados mecanismos del control molecular de la expresión génica y de la genética se fundamentan en el modelo que propone la estructura del ADN.

Hoy, 50 años después del formidable descubrimiento de la estructura del ADN, hemos pasado a la generación de animales transgénicos; y de la doble hélice a la secuenciación de genomas completos, incluyendo el de nuestra especie. Vivimos una era en la que la biología molecular y la genómica, y sus variadas aplicaciones prometen darnos un mayor control sobre nuestro entorno biológico y sobre el destino de nuestra especie.

Nunca antes en la historia de la humanidad hemos estado tan cerca de responder las preguntas básicas que nos hemos planteado desde los orígenes de nuestra civilización: ¿Quiénes somos? y ¿de donde venimos? La genética y biología molecular modernas nos han permitido conocer con gran precisión nuestro lugar en la evolución y nuestro parentesco con el resto de los seres vivos. Buena parte de este conocimiento descansa en el que tenemos sobre la estructura y funcionamiento del ADN.

Luis Alfonso Vaca Domínguez y
Alejandro Zentella Dehesa
Departamento de Biología Celular,
Instituto de Fisiología Celular de la UNAM

EL PAPEL DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS*

LILIAN GONZÁLEZ-SEGURA^{1,2} Y ROSARIO A. MUÑOZ-CLARES²

RESUMEN

La cisteína es uno de los residuos de aminoácidos menos abundante en las proteínas. A pesar de ello, la gran capacidad del grupo tiol de su cadena lateral de pasar del estado reducido a diferentes estados oxidados, le permite a este residuo participar en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas. Así, los residuos de cisteína juegan un papel importante en la estabilidad, en el plegamiento, en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad proteica. Esta revisión presenta un panorama general de estos papeles y de las diferentes formas en las cuales se pueden encontrar los residuos de cisteína de acuerdo a la función que estén llevando a cabo.

PALABRAS CLAVE: Tiol, tiolato, puente disulfuro, ácido sulfénico, *S*-nitrosilación, *S*-tiolación.

ABSTRACT

Cysteine is among the least abundant amino acid residues found in proteins. In spite of this, their great capacity for being oxidized to different states allows these residues to participate in many aspects of protein structure and function. Cysteine residues thus play important roles in protein stability, folding, metal binding, enzymatic catalysis and regulation of protein activity. This review presents a general view of the roles and different forms of these residues in proteins, according to the function carried out.

KEY WORDS: Thiol, thiolate, disulfide bridge, sulfenic acid, *S*-nitrosylation, *S*-thiolation.

INTRODUCCIÓN

Se ha observado que la cisteína (Fig. 1) es uno de los residuos de aminoácidos menos abundantes en las proteínas, con un porcentaje menor al 3 %. Sin embargo, a pesar de su abundancia relativamente baja, la capacidad del grupo tiol para donar electrones y para oscilar entre un estado reducido (-SH) y diversos estados oxidados, le permite a este residuo participar en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas. Así, los residuos de cisteína juegan un papel importante en la estabilidad, en el plegamiento, en la unión

de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad proteica.

Los diferentes estados de oxidación del grupo tiol de los residuos de cisteína son el ácido sulfénico (-SOH), el ácido sulfínico (-SO₂H), el ácido sulfónico (-SO₃H) y el puente disulfuro (-S-S-). Tanto la oxidación a ácido sulfénico como la que conlleva la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína, son reversibles por agentes reductores, mientras que los otros dos estados de oxidación, ácidos sulfínico y sulfónico, no pueden ser re-

ducidos a cisteína (Fig. 2). El ácido sulfénico es muy inestable y, si no se encuentra en un ambiente apropiado que lo proteja de la oxidación posterior, fácilmente se oxida irreversiblemente a sulfínico o sulfónico, o forma un puente disulfuro si está cercano a otro tiol (1).

PARTICIPACIÓN DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN LA ESTABILIDAD Y EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS

La cisteína es un aminoácido que posee un grupo tiol muy reactivo, que no se ioniza a pH fisiológico y que forma puentes de hidrógeno re-

* Recibido: 10 de diciembre de 2002. Aceptado: 11 de marzo de 2003

¹ Laboratorio de Osmorregulación, F. E. S. Iztacala., Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios No. 1, Tlalnepantla, Estado de México, 54090, México y ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., 04510, México. Tel. 5622-52-76, Fax 5622-53-29. Correo E:liliang@servidor.unam.mx.

lativamente débiles, por lo que no contribuye significativamente a la estabilidad de las proteínas por medio de enlaces salinos o de puentes de hidrógeno. No obstante, si los grupos tiol de dos residuos de cisteína de la misma cadena o de cadenas polipeptídicas diferentes están próximos y en la orientación adecuada, pueden unirse por oxidación formando un puente disulfuro, que es un enlace covalente fuerte. Estos enlaces estabilizan la estructura nativa de la proteína, haciéndola menos susceptible a la degradación por proteasas y disminuyendo el número de las conformaciones desplegadas posibles características del estado desnaturalizado, el cual al disminuir de esta forma su entropía conformacional resulta energéticamente más difícil de alcanzar.

El papel de los residuos de cisteína en la estabilización de la estructura nativa de una proteína depende de la localización de esta última. Puesto que bajo condiciones normales el ambiente en el interior de las células es altamente reductor, las proteínas intracelulares no dependen de puentes disulfuro para estabilizar su conformación nativa. Por el contrario, si éstos llegan a formarse bajo una condición de estrés oxidativo, generalmente se altera la estructura nativa de tal forma que se pierde la función de la proteína. El mantenimiento de los grupos -SH de las proteínas intracelulares en su forma reducida se lleva a cabo por tiorredoxinas y glutatión, de los que hablaremos más adelante. En el caso de las proteínas extracelulares, sin embargo, algunos residuos de cisteína forman frecuentemente puentes disulfuro, confirmando una estabilidad adicional a la proteína en cuestión que le permite enfrentar ambientes con condiciones más extremas que las intracelulares.

En las células eucariontes, la for-

mación de un puente disulfuro en las proteínas nacientes que van a ser exportadas ocurre en el retículo endoplásmico (RE), proceso que es simultáneo a la traducción y que tiene un impacto importante en el plegamiento correcto de la proteína. El plegamiento incorrecto de las proteínas produce su retención en el RE y su posterior degradación. En el lumen del RE, todas las células poseen la enzima llamada proteína disulfuro isomerasa (PDI), perteneciente a la superfamilia de las tiorredoxinas, que ayuda al plegamiento correcto de los polipéptidos que poseen puentes disulfuro. La PDI cataliza reacciones de intercambio tiol:disulfuro, que incluyen la formación, reducción e isomerización de puentes disulfuro (2). La actividad de oxidorreductasa de la PDI, por la cual realiza el rearrreglo de los puentes disulfuro, depende de un par de residuos de cisteína de su sitio activo, en el motivo CXXC característico de toda la familia de tioldisulfuro oxidorreductasas (3),

que forman un puente disulfuro y que participan en la oxidación de las proteínas que se pliegan, como se muestra en la figura 3. El proceso de isomerización involucra ciclos sucesivos de oxidación y reducción hasta que, por ensayo y error, se llega a la formación de los disulfuros nativos, que son resistentes a una posterior isomerización por ser inaccesibles. La PDI discrimina entre los puentes disulfuro nativos y no nativos, de manera que isomeriza sólo los últimos. La formación de puentes disulfuro en células eucariontes requiere, además, de otra proteína denominada Ero1p. Ésta es una glicoproteína asociada a la membrana del RE que introduce, en el lumen de este último, los equivalentes de oxidación necesarios para la formación de un puente disulfuro. La PDI se oxida a través de un intercambio ditiol-disulfuro con la Ero1p, que queda reducida. Se desconoce la proteína que lleva a cabo la regeneración del estado oxidado al reducido de la Ero1p (4).

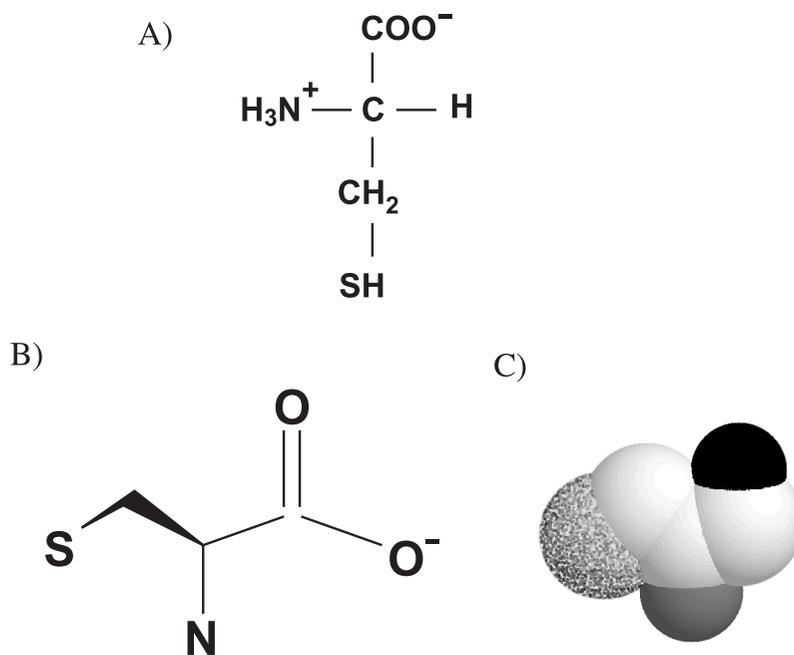


Figura 1. Estructura química (A) y modelo de la cisteína (B) y (C). En C) los carbonos están representados por esferas blancas, el oxígeno por la esfera negra, el azufre por la gris clara y el nitrógeno por la gris oscura.

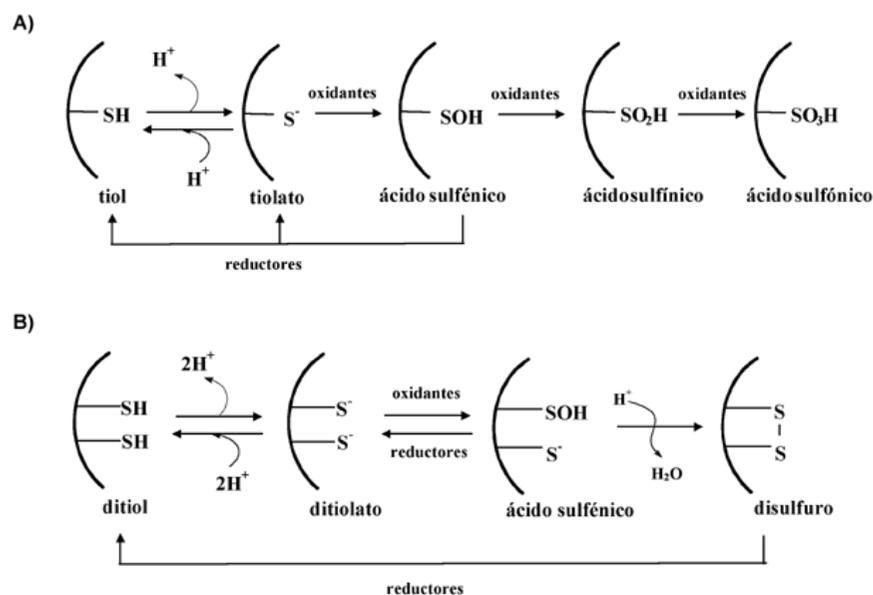


Figura 2. Estados de oxidación del grupo tiol de la cisteína.

En procariontes, la formación de los puentes disulfuro ocurre en el periplasma, mediante un proceso semejante al descrito en eucariotes (5). La contraparte de la PDI es el sistema Dsb (el sistema de formación de puentes disulfuro), el cual consiste de por lo menos seis proteínas redox pertenecientes también a la superfamilia de las tiorredoxinas: DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, DsbE y DsbG. De ellas, la DsbA y la DsbB son las equivalentes a la PDI y la Ero1p, respectivamente, sólo que en el caso de la DsbA su única función es la formación de puentes disulfuro, por lo que requiere de otra proteína que actúe como disulfuro isomerasa, que es la DsbC. La DsbD mantiene el estado reducido de la DsbC. La DsbE probablemente está involucrada en la transferencia de electrones para la maduración del citocromo *c* en el periplasma de *Escherichia coli*, aunque su función biológica permanece ambigua y su estructura no ha sido resuelta, y la DsbG funciona predominantemente como reductora o como catalizadora de la isomerización de disulfuros.

PARTICIPACIÓN DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN MECANISMOS DE REGULACIÓN

Como ya hemos mencionado, la oxidación de los residuos de cisteína generalmente produce pérdida de la función de las proteínas intracelulares. Sin embargo, existe un importante mecanismo de regulación de numerosos procesos celulares que se basa en modificación reversible por oxidación-reducción específica de residuos de cisteína de proteínas involucradas en la catálisis, la expresión génica, la transducción de señales, el plegamiento (chaperonas), etc. Estas modificaciones incluyen la formación y ruptura de puentes disulfuro, ya sea de la misma proteína o de disulfuros mixtos con otro tiol como el glutatión, la formación de ácido sulfénico, o la *S*-nitrosilación. Actualmente, este mecanismo de regulación por modificación covalente reversible se considera equiparable, en cuanto a su relevancia en el control biológico, a aquellos que implican otras modificaciones post-traduccionales como fosforilación, glicosilación o metilación.

Existen principalmente tres siste-

mas de regulación que involucran formación-ruptura de puentes disulfuro en las proteínas blanco: el sistema ferredoxina/tiorredoxina, el sistema NADP⁺/tiorredoxina y el sistema glutarredoxina. En estos sistemas las tiorredoxinas juegan un papel central.

Las tiorredoxinas son proteínas con una masa molecular de 12 kDa que se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y bacterias. El sitio activo de la tiorredoxina tiene dos residuos de cisteína en una secuencia altamente conservada [-Tyr-Cys-Gly/Ala-Pro-Cys-]. La forma oxidada de la tiorredoxina contiene un puente disulfuro que puede ser reducido a dos tioles por el sistema ferredoxina o por el sistema NADP⁺/tiorredoxina. Las tiorredoxinas reducidas son excelentes reductores de puentes disulfuro de proteínas, llevando a cabo esta reacción mucho más rápidamente, por varios órdenes de magnitud, que el glutatión (GSH), o que el ditioneitol (DTT), un agente no fisiológico reductor de tioles y disulfuros (6). El potencial de reducción estándar de la familia de las tiorredoxinas se encuentra en un intervalo de -0.124 a -0.270 V, siendo la tiorredoxina de *Escherichia coli* el miembro más reductor (-0.270 V). Por otra parte, los potenciales de reducción estándar del glutatión y del DTT son de -0.205 V y de -0.330 mV, respectivamente.

SISTEMA FERREDOXINA/TIORREDOXINA

El sistema ferredoxina/tiorredoxina consiste de tres componentes: la ferredoxina (Fd), la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR), que es una proteína hierro-azufre, y la tiorredoxina. Este sistema funciona como un mecanismo general de regulación de enzimas mediado por luz en la fotosíntesis oxigénica, que

está presente en cianobacterias, algas eucarióticas y plantas superiores. Las enzimas blanco poseen un par de residuos de cisteína vecinales a la distancia y orientación correctas para formar un puente disulfuro. Durante el día, los electrones provenientes de la excitación de la clorofila se transfieren, vía Fd y una enzima hierro-azufre (la FTR), a una tiorredoxina, la que una vez reducida funciona en la reducción de la forma oxidada de la enzima blanco, llevándola de su forma inactiva con un puente disulfuro (-S-S-) a su forma activa con dos tioles (-SH)₂ (Fig. 4 A). Posteriormente, las enzimas activas son oxidadas y regresadas a su estado inactivo en la oscuridad (8).

SISTEMA NADP⁺/TIORREDOXINA

En el sistema NADP⁺/tiorredoxina la reducción de la tiorredoxina oxidada no se lleva a cabo por la ferredoxina sino por el NADPH, en una reacción catalizada por la NADP⁺-tiorredoxina reductasa (NTR), la cual contiene como grupo prostético el flavín adenín dinucleótido (FAD) (Fig. 4 B).

El sistema NADP⁺/tiorredoxina está presente en múltiples compartimentos celulares de una gran variedad de organismos, estando involucrado en procesos tales como el control de la división y proliferación celular, la acción hormonal, la replicación del ADN, la meiosis, el desarrollo embrionario temprano, la reparación y ensamble de proteínas y la germinación de semillas (9). La regulación por oxidación-reducción es un mecanismo general de control de los factores de transcripción como Fos, Jun y OxyR, los cuales requieren residuos de cisteínas libres para unirse al ADN.

El sistema NADP⁺/tiorredoxina reduce además específicamente una variedad de proteínas blanco que tienen puentes disulfuro intramoleculares, como es el caso de los inhibidores de

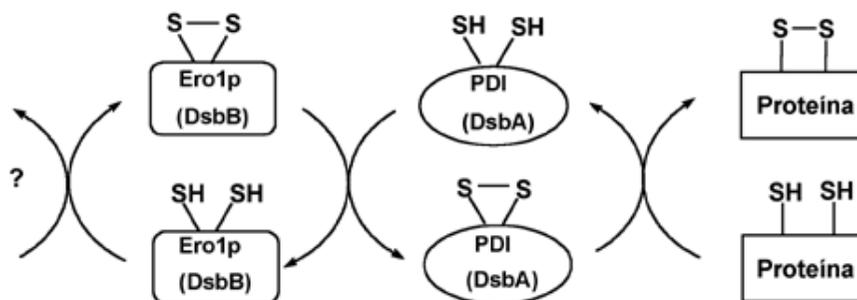


Figura 3. Modelo del mecanismo de acción de las proteínas disulfuro isomerasa (PDI) y *Ero1p* presentes en el retículo endoplásmico de eucariotos y de sus contrapartes de procariontos *DsbA* y *DsbB* (entre paréntesis).

α -amilasas y de tripsina, y de neurotoxinas de diferentes venenos de víbora, escorpión y abeja. La reducción de los puentes disulfuro produce la inactivación de estas proteínas.

SISTEMA GLUTARREDOXINA

El sistema glutarredoxina consiste de las glutarredoxinas (Grx), la glutathion reductasa (GR) y el γ -glutamil-cisteinil-glicina, un tripéptido llamado comúnmente glutathion (GSH) (Fig. 4 C) (9). Las Grx son proteínas pequeñas que pertenecen a la superfamilia de las tiorredoxinas y que tienen la secuencia del par de residuos de cisteína del sitio activo característica de esta familia. Las Grx son el componente clave de este sistema, ya que pueden reducir disulfuros de proteínas directamente vía sus dos tioles del sitio activo, los cuales son convertidos a disulfuro (9). La regeneración de la Grx oxidada se lleva a cabo por el GSH.

El GSH está distribuido universalmente en bacterias, plantas y animales, y probablemente es el péptido simple más abundante. Su forma reducida (GSH) contiene un tiol funcional aportado por un residuo de cisteína. El GSH funciona como un agente reductor y su concentración en las células está en el intervalo de 1 a 10 mM. La forma oxidada (GSSG) consiste de dos moléculas de glutathion unidas por un puente disulfuro. La GR cataliza la reducción,

dependiente de NADPH, de GSSG a GSH. Para la transferencia de electrones, la GR usa FAD como grupo prostético, al igual que la NTR. Esta reacción es muy importante en los procesos metabólicos y normalmente produce una proporción de GSH:GSSG de más de 100:1, lo que permite al GSH funcionar como un agente reductor intracelular.

S-TIOLACIÓN

Las cisteínas son los residuos de las proteínas más fácilmente oxidados. Su oxidación puede resultar en entrecruzamiento intra o intermolecular, por formación de puentes disulfuro, e inactivación de proteínas, lo que finalmente conduce a la muerte celular. La oxidación irreversible de residuos de cisteína en las proteínas puede evitarse mediante una S-tiolación, un proceso mediante el cual los grupos tiol de la proteína forman disulfuros mixtos con tioles de bajo peso molecular como el GSH. La S-tiolación es una respuesta al estrés oxidativo que está fuertemente regulada por factores celulares aún desconocidos. Prueba de ello es que el tratamiento de las células con diferentes agentes oxidantes produce diferentes patrones de proteínas S-tioladas, a pesar de que las proteínas muestran la misma sensibilidad a estos agentes *in vitro*. La destiolación se lleva a cabo *in vivo* una vez que se supera el estrés oxidativo, por la acción de una

glutarredoxina monotiol, que a diferencia de las glutarredoxinas clásicas ya descritas contiene sólo un residuo de cisteína en su sitio activo (10).

S-NITROSILACIÓN

El óxido nítrico (NO) es una molécula señal que regula muchos procesos biológicos a través de modular la actividad de una gran variedad de proteínas por medio de una reacción de S-nitrosilación de los residuos de cisteína de sus blancos. Los compuestos que llevan a cabo esta reacción son los productos de la oxidación del NO por el oxígeno molecular, el NO₂ y el N₂O₃. Otros mecanismos por el que los residuos de cisteína pueden nitrosilarse es por transferencia directa de un grupo NO desde otra proteína S-nitrosilada o de un nitrosotiol como el S-nitroglutation (GSNO). Existen motivos consenso para la nitrosilación de residuos de cisteínas específicos. Tanto la nitrosilación como la desnitrosilación son reacciones no catalizadas por enzimas. La nitrosilación se favorece si el grupo tiol está en forma de tiolato o situado en un ambiente hidrofóbico. La desnitrosilación puede llevarse a cabo por reductores celulares, cambios en el pH o en la concentración de O₂, o por translocación de una proteína de un compartimento celular que permita un S-NO estable a otro que, por sus condiciones redox, favorezca la desnitrosilación. Por ejemplo, ciertas caspasas mitocondriales están normalmente inactivas por S-nitrosilación de su residuo catalítico de cisteína, pero se activan cuando se liberan al citoplasma, en respuesta a una señal apoptótica, y son desnitrosiladas, contribuyendo así al proceso de apoptosis (11).

PARTICIPACIÓN DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

En el ambiente intracelular los residuos de cisteína de las proteínas jue-

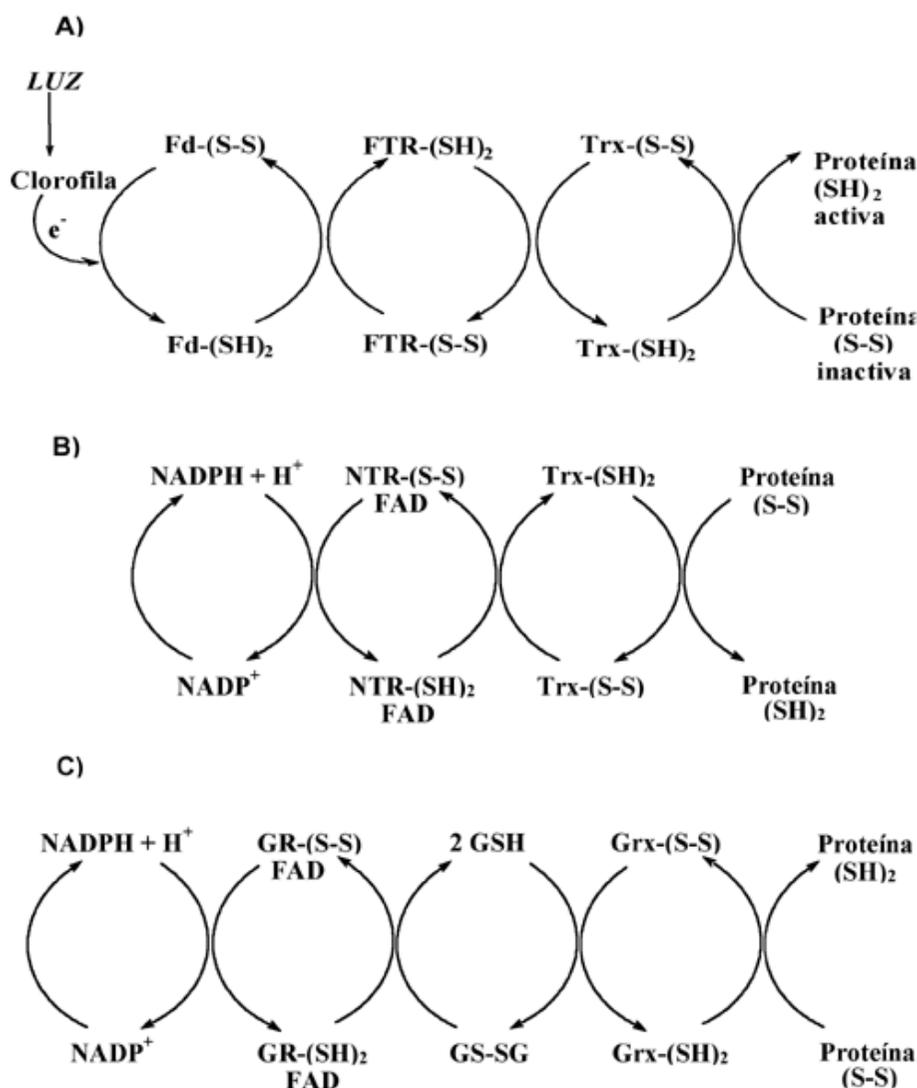


Figura 4. Representación esquemática de los sistemas de regulación: A) ferredoxina/tiorredoxina; B) NADP⁺/tiorredoxina y C) glutarredoxina. Fd: ferredoxina, FTR: ferredoxina-tiorredoxina reductasa, Trx: tiorredoxina, NTR: tiorredoxina reductasa, GR: glutathione reductasa, Grx: glutarredoxina. Figura modificada de Buchanan y col. (8) y Holmgren (9).

gan un papel funcional más que estructural, participando en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad de enzimas o de otras proteínas involucradas en diversos procesos (tales como el ciclo celular, la acción hormonal, la replicación del ADN, la transcripción, la meiosis, el desarrollo embrionario temprano, la reparación y el ensamblaje de proteínas, la germinación de semillas, etc.), como acabamos de ver.

UNIÓN DE METALES

El grupo tiol de la cadena lateral de las cisteínas es excelente para unir metales, -particularmente el zinc-, por lo que estos residuos forman parte tanto de motivos estructurales conocidos como los dedos de zinc como del sitio activo de enzimas que usan este metal en su mecanismo catalítico.

Los dedos de zinc, cuya función es unir ADN y ARN, se encuentran en factores de transcripción de euca-

riotos, en receptores hormonales nucleares, en enzimas del metabolismo de los ácidos nucleicos, como topoisomerasas, en otras enzimas como la proteína cinasa C, en la subunidad reguladora de la aspartato transcarbamoylase y en proteínas antivirales. Existen diferentes tipos de dedos de zinc, agrupados de acuerdo al residuo de cisteína o histidina y al número de estos residuos que intervienen en la unión del ion zinc (12).

Entre las enzimas que poseen residuos de cisteína en su sitio activo para unir un átomo de zinc se encuentran las metaloproteinasas de la matriz extracelular, que juegan un papel importante en la degradación tanto fisiológica como patológica de esta matriz. Una actividad incrementada de estas enzimas se produce en enfermedades como artritis, cáncer y esclerosis múltiple, por lo que son un blanco para el diseño de fármacos frente a estas enfermedades.

Residuos de cisteína también participan en la unión de las agrupaciones hierro-azufre (Fe-S), que son cofactores de proteínas que juegan importantes papeles en el metabolismo, la transferencia de electrones y la regulación de la expresión génica (13).

Finalmente, otro ejemplo de cómo

los residuos de cisteína pueden participar en la unión de metales es el de las metalotioneínas, proteínas pequeñas ricas en residuos de cisteína cuya biosíntesis está regulada por los niveles de exposición de un organismo a zinc, cobre, cadmio y otros metales pesados y cuya posible función es la desintoxicación de estos metales (14).

CATÁLISIS ENZIMÁTICA

En el sitio activo de algunas enzimas se encuentra un residuo de cisteína altamente reactivo, responsable de la catálisis nucleofílica en la que el sustrato es modificado por la formación de un enlace covalente con la enzima para dar un intermediario reactivo.

Los grupos nucleofílicos de las enzimas que comúnmente funcionan en la catálisis covalente son el grupo imidazol de los residuos de histidina, el grupo hidroxilo de los residuos de serina y el grupo tiol de los residuos de cisteína, que es el nucleófilo más potente de los tres. Enzimas conocidas que usan el grupo tiol de un residuo de cisteína en catálisis nucleofílica son: 1) las aldehído deshidrogenasas, que catalizan la oxidación irreversible de los aldehídos dependiente de NAD(P)⁺; 2) las tiol proteasas como la papaína y la brome-

laína, que prehidrolizan las proteínas y favorecen la digestión de las mismas; las caspasas, proteasas que juegan un papel fundamental en la apoptosis, y las catepsinas, proteasas funcionales en la respuesta inmune; 3) las carbamoil fosfato sintetasas, que producen el carbamoil fosfato utilizado en la síntesis de arginina y pirimidinas en los organismos superiores; 4) las peroxirredoxinas, enzimas que destruyen el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos reduciéndolos a agua o a su correspondiente alcohol, respectivamente, y que por tanto juegan un papel importante en la respuesta de las células al estrés oxidativo; 5) las proteína tirosina fosfatasa, que están involucradas en los mecanismos de transducción de señales; 6) las poliquétido sintetasas, que producen una serie de productos naturales que son usados como antibióticos, agentes anticancerígenos, etc. y 7) las tiol:disulfuro oxidoreductasas, como las tioredoxinas, glutarredoxina, la FTR, la NTR, la GR, que, como hemos visto, participan en la regulación de la actividad de muchas proteínas intracelulares manteniendo o recuperando el estado reducido de sus cisteínas (Tabla I).

El mecanismo de catálisis de las aldehído deshidrogenasas, de las tiol

TABLA I

PROTEÍNAS QUE UTILIZAN AL TIOL DE UN RESIDUO DE CISTEÍNA COMO GRUPO NUCLEOFÍLICO	
PROTEÍNAS	INTERMEDIARIO
Aldehído deshidrogenasas	Tiohemiacetal
Tiol proteasas	Tioéster
Carbamoil fosfato sintetasas	Tioéster
Peroxirredoxinas (1 Cys)	Ácido sulfénico
Peroxirredoxinas (2 Cys)	Ácido sulfénico y disulfuro
NADH peroxidasa	Ácido sulfénico y disulfuro mixto
Proteína tirosina fosfatasa	Tiol-fosfato
Poliquétido sintetasas	Tioéster
Tiol:disulfuro oxidoreductasas*	Disulfuro mixto

* Incluyen: Ferredoxina-tioredoxina reductasa, NADP⁺-tioredoxina reductasa, glutathion reductasa, PDI, DsbA, tioredoxinas y glutarredoxinas.

proteasas y de las carboxil fosfato sintetasas consiste en la formación de un intermediario covalente, denominado acil enzima, que es resultado del ataque nucleofílico del grupo tiol del sitio activo sobre el carbono carbonilo del enlace susceptible -ya sea aldehído, amida o éster- del sustrato. El enlace covalente formado entre la enzima-sustrato (tioéster) es posteriormente hidrolizado para liberar los productos de la reacción, como se muestra esquemáticamente en las figuras 5 A y 5 B (15).

En realidad es el ion tiolato (S^-), no la forma tiol ($-SH$), la especie que es reactiva como nucleófilo, por lo que la reactividad del residuo de cisteína catalítico está determinada, además de por su accesibilidad al solvente, por la fracción del tiol que está presente en la forma de tiolato y por la reactividad intrínseca de este tiolato. Los dos últimos factores dependen de la basicidad del grupo tiol, es decir de su pK_a . El valor de pK_a del tiol del residuo de cisteína libre es de 8.9, y de ser éste el del residuo de cisteína catalítico, las enzimas mencionadas anteriormente no serían activas a valores de pH fisiológicos. Se requiere por lo tanto que el grupo tiol del residuo de cisteína del sitio activo sufra una activación inicial para que esté presente en la forma de tiolato. Esto implica que el ambiente del sitio activo esté diseñado de tal manera que la cisteína catalítica sea accesible y que su pK_a esté considerablemente disminuido. Los estudios de modificación química realizados con la papaína (16), revelaron que una forma de activación química del tiol del residuo de cisteína esencial es la formación de un par iónico con un residuo de un aminoácido cargado positivamente (histidina en este caso). Este mecanismo de activación del tiol catalítico se ha encontrado posteriormente en otras

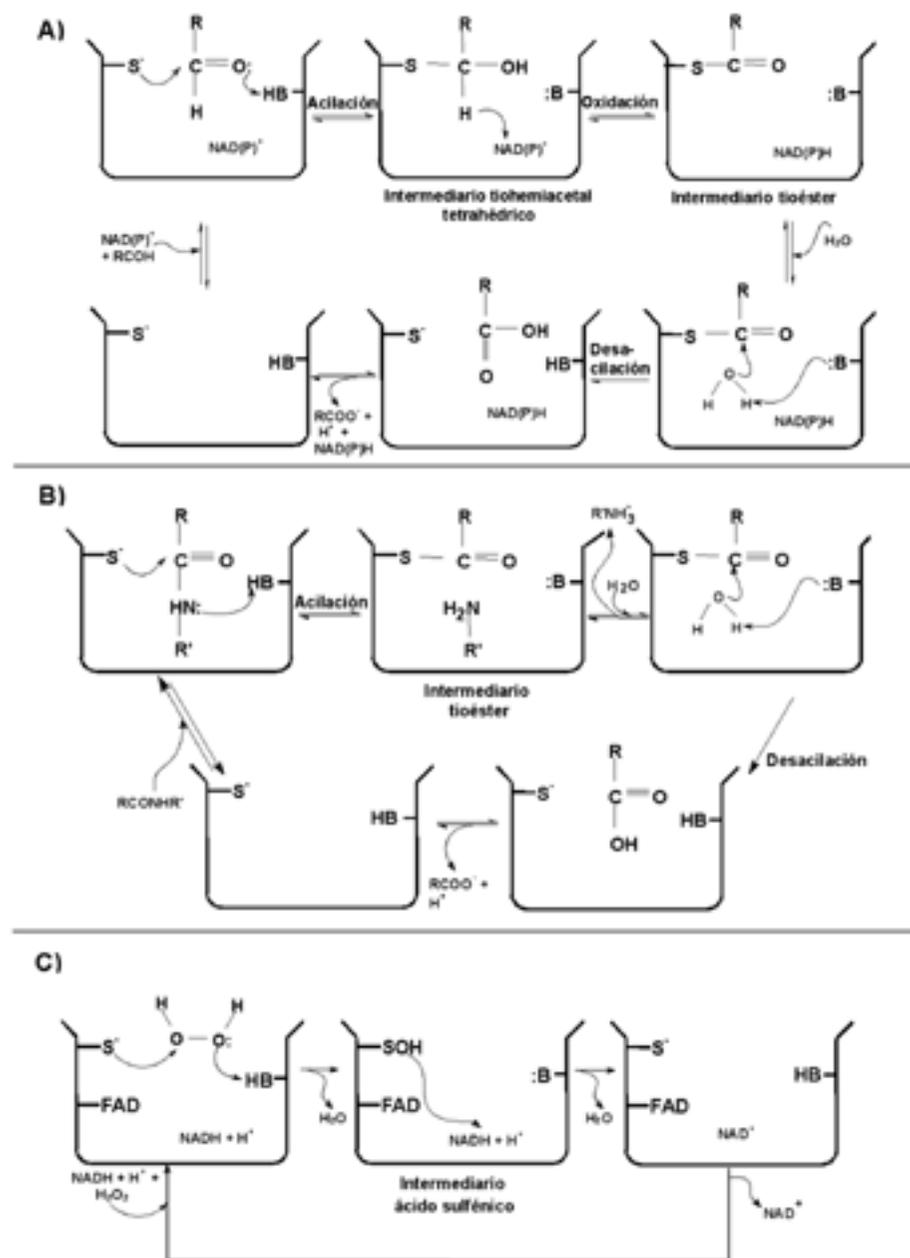


Figura 5. Mecanismo químico de reacción de las aldehído deshidrogenasas (A), de las tiol proteasas (B) y de la NADH peroxidasa (C). Figura modificada de Farrés y col. (15) y Yeh y col. (19).

enzimas, como la betaína aldehído deshidrogenasa (17). La formación de pares iónicos provoca así una disminución de varias unidades de pH en el pK_a del tiol y, por lo tanto, a los valores de pH del medio intracelular y extracelular el residuo de cisteína catalítica está mayoritariamente en forma de tiolato. La localización del residuo de cisteína nucleofílica en el extremo amino ter-

minal de una alfa hélice es otro mecanismo usado por las enzimas para disminuir su pK_a , ya que las cargas parciales positivas del dipolo-hélice estabilizan al tiolato. Otro mecanismo de activación de los residuos de cisteína catalítica, descrito en una aldehído deshidrogenasa, utiliza a un grupo carboxilo de un residuo de glutámico que toma el protón del tiol convirtiéndolo en tiolato (18).

En el caso de las peroxirredoxinas de una cisteína, el tiolato catalítico realiza un ataque nucleofílico sobre el peróxido, lo que resulta en la formación de ácido sulfénico (-SOH) en el sitio activo. El ácido sulfénico es muy inestable y ha de ser estabilizado, o de lo contrario se oxida rápida e irreversiblemente a sulfínico o sulfónico, lo que llevaría a la inactivación de la enzima. La estabilización del sulfénico dentro de la cavidad del sitio activo de estas enzimas puede llevarse a cabo por un puente de hidrógeno intramolecular, por una accesibilidad al solvente limitada, por la asociación con elementos apolares de la estructura de la proteína, o por la transferencia de carga del sulfenato con el anillo del FAD deficiente en electrones. El ácido sulfénico posteriormente reacciona con el GSH para regenerar la enzima activa (Fig. 5 C). Existen otras peroxirredoxinas que poseen dos residuos de cisteína en su sitio activo, por los que se las conoce como peroxirredoxinas de dos cisteínas. En estas enzimas, el tiolato de una de las cisteínas forma el sulfénico al reaccionar con el peróxido y, posteriormente, un disulfuro con el otro tiol. La enzima recupera su estado reducido al reaccionar con la tiorredoxina o el GSH. Otras enzimas, como la NADH peroxidasa y la NADH oxidasa, tienen mecanismos de catálisis similares, con formación de un intermediario sulfénico estable en su sitio activo (19).

Las proteína tirosina fosfatasas catalizan la hidrólisis de fosfotirosina liberando fosfato y el residuo de tirosina. Su mecanismo de acción involucra la formación de un intermediario transitorio fosfoenzima,

resultado del ataque nucleofílico del tiolato del sitio activo sobre el grupo fosfato del sustrato, la fosfotirosina de la proteína blanco.

En el caso de las poliquétido sintetas el ataque nucleofílico del tiolato del residuo de cisteína catalítico es sobre la coenzima A, formándose un intermediario acil-enzima.

En cuanto a las tiol:disulfuro oxidoreductasas, su mecanismo de reacción consiste en un ataque nucleofílico del tiolato de una de las dos residuos de cisteína que forman parte de su sitio activo sobre el disulfuro que se va a reducir. Como resultado de este ataque nucleofílico, se forma un disulfuro mixto con un residuo de cisteína del sustrato. Posteriormente, el otro residuo de cisteína del sitio activo ataca este disulfuro mixto liberando el tiol del sustrato y formando el disulfuro en el sitio activo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El estudio del papel de los residuos de cisteína presentes en muchas proteínas ha cobrado gran importancia debido a que, como se ha descrito anteriormente, éstos participan en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas. En forma paralela, la modificación de las cisteínas con fines biotecnológicos o farmacológicos está siendo abordada por numerosos laboratorios.

La facilidad con que los residuos de cisteína pueden formar puentes disulfuro inter o intramoleculares en ambientes oxidantes como es el aire, y el papel que juegan al formar puentes disulfuro en el mantenimiento de la estructura nativa de muchas proteínas, ya sea estabilizándolas o inactivándolas, ha propi-

ciado el que proteínas con aplicaciones biotecnológicas, —particularmente en biocatálisis—, sean manipuladas por mutagénesis sitio-dirigida. En este tipo de estudios se introducen residuos de cisteína que formen puentes disulfuros donde no los había, y de esta manera se busca incrementar la estabilidad de la proteína, o bien se reemplazan residuos de cisteína no esenciales, evitando así inactivación por formación de puentes disulfuro no deseados.

Como ejemplos de los estudios en los que los residuos de cisteína han sido considerados como un blanco atractivo para compuestos con acción farmacológica, son aquellos realizados con las aldehído deshidrogenasas y la triosa fosfato isomerasa. En el primer caso, el compuesto usado es el disulfiram (bis(dietilditiocarbamoil)disulfuro), que inhibe la aldehído deshidrogenasa hepática (ALDH2) modificando covalentemente su residuo de cisteína catalítico. La inhibición de esta enzima produce una elevación de acetaldehído después de una ingestión de alcohol, lo que provoca náuseas, vómito, taquicardia e hipotensión, por lo que este fármaco se ha utilizado clínicamente desde hace 50 años como tratamiento del alcoholismo. En el segundo caso, recientemente se ha encontrado que la modificación química de un residuo de cisteína que se encuentra en la interfase de la triosa fosfato isomerasa de ciertos parásitos produce la inactivación de la enzima por pérdida de su estructura cuaternaria. Por esta razón, se está explorando la posibilidad de que esta enzima sea un blanco para el diseño de compuestos con acción farmacológica contra enfermedades parasitarias (20). 

REFERENCIAS

1. Denu J y Tanner K (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37: 5633-5642.
2. Creighton T E (1992) Folding pathways determined using disulfide bonds. En: *Protein Folding* (ed T E Creighton), W H Freeman, New York, pp 301-351.
3. Chivers P T, Prehoda K E y Raines R T (1997) The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry* 36: 4061-4066.
4. Tu B P, Ho-Schleyer S C, Travers K J y Weissman J S (2000) Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 290: 1571-1574.
5. Katzen F y Beckwith J (2002) Disulfide bond formation in periplasm of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 348: 54-66.
6. Arnér E y Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267: 6102-6109.
7. Cleland W W (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH group. *Biochemistry* 3: 480-482.
8. Buchanan B B, Schürmann P, Decottignies P y Lozano R M (1994) Perspectives in biochemistry and biophysics. Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine. *Arch Biochem Biophys* 314: 257-260.
9. Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264: 13963-13966.
10. Shenton D, Perrone G, Quinn A K, Dawes, I W y Grant C M (2002) Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277:16853-16859.
11. Mannick J B y Schonhoff C M (2002) Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch Biochem Biophys* 408: 1-16.
12. Schwabe J W R y Klung A (1994) Zinc mining for protein domains. *Nature Struct Biol* 1: 345-349.
13. Gerber J y Lill R (2002) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* 2: 71-86.
14. Narula S S, Brouwer M, Hua Y y Armitage I M (1995) Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 34: 620-631.
15. Farrés J, Wang T, Cunningham J y Weiner H (1995) Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site directed mutagenesis. *Biochemistry* 34: 2592-2598.
16. Polgár L (1973) On the mode of activation of the catalytically essential sulfhydryl group of papain. *Eur J Biochem* 33: 104-109.
17. González-Segura L, Velasco-García R. y Muñoz-Clares R A (2002) Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 361: 577-585.
18. Wang X y Weiner H (1995) Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 34: 237-243.
19. Yeh J I, Claiborne A, y Hol W G (1996) Structure of the native cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase refined at 2.8 Å resolution. *Biochemistry* 35: 9951-9957.
20. Téllez-Valencia A, Ávila-Rios S, Pérez-Monfort R, Rodríguez-Romero A, de Gómez-Puyou M T, López-Calahorra F y Gómez-Puyou A (2002) Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Comm* 295: 958-963.

ESTRUCTURA, CINÉTICA Y PAPEL DE LA PIRUVATO FOSFATO DICINASA: UNA ENZIMA BLANCO PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS Y CLAVE EN LA FOTOSÍNTESIS C₄*

Marcela Lilián Varela Gómez

RESUMEN

La piruvato fosfato dicinasa (PPDK) cataliza la transferencia de los grupos fosfato del pirofosfato (PPi) y del fosfoenolpiruvato (PEP) a una molécula de AMP para sintetizar ATP, fosfato y piruvato. Se ha encontrado en una gran variedad de organismos, desde bacterias y protistas parásitos hasta plantas de tipo C₄ como el maíz. Esta enzima se propone como un blanco potencial para el diseño de fármacos en contra de los parásitos que la poseen debido a que no está presente en el hospedero humano. En este trabajo se da una visión global acerca de lo que actualmente se conoce sobre la PPDK.

PALABRAS CLAVE: piruvato fosfato dicinasa, enzimas dependientes de pirofosfato, fotosíntesis C₄.

ABSTRACT

Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) catalyzes the transfer of phosphate groups from pyrophosphate (PPi) and phosphoenolpyruvate (PEP) to AMP and synthesizing ATP, phosphate and pyruvate. This enzyme occurs in a great variety of organisms such as bacteria, protist parasites, and C₄ plants like maize. Because it is absent from the human host, PPDK has been considered an important target for drug design against parasites. This article reviews the current knowledge about PPDK.

KEY WORDS: pyruvate phosphate dikinase, pyrophosphate-dependent enzymes, C₄ photosynthesis

INTRODUCCIÓN

La piruvato fosfato dicinasa (PPDK) cataliza de manera reversible la transferencia de los grupos fosfato del PEP y el PPi a una molécula de AMP (Fig. 1).

La PPDK se encontró de manera independiente, pero casi simultánea, a finales de la década de los sesentas en las bacterias *Clostridium symbiosum* (1) y *Propionibacterium shermanii* (2), en el protista parásito *Entamoeba histolytica* (3) y en las hojas de varias plantas C₄ tales como el maíz (4). Actualmente existen reportes de PPDK en una gran variedad de seres vivos que van desde organismos unicelulares marinos co-

mo una especie de actinomiceto termófilo (5), pasando por protistas de vida libre como *Euglena gracilis* y protistas parásitos como *Giardia duodenalis* (6), *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania spp.* (7), hasta plantas de tipo C₃ tales como el arroz (8) y algunas especies de plantas con metabolismo C₃-C₄ como *Flaveria* y *Eleocharis* (9, 10). Es importante hacer notar que hasta la fecha no existen reportes de esta enzima en ningún representante del reino animal.

El análisis filogenético de Maldonado y Fairlamb (11) muestra que las PPDKs de tripanosomátidos, bacterias y otros protistas for-

man un grupo diferente del que incluye a las de plantas, lo cual sugiere que la adquisición de este gen pudo haber ocurrido mediante un evento de transferencia horizontal durante los procesos endosimbióticos en los ancestros de estos organismos unicelulares.

REACCIÓN QUE CATALIZA

Mediante estudios de intercambio isotópico se determinó que en presencia de ³²P-fosfoenolpiruvato la PPDK de *E. histolytica* sintetiza ATP marcado en la posición β. Al hacer el experimento en presencia de PPi radiactivo se obtuvo ATP marcado en la posición γ (1-3) (Fig.

*Recibido: 26 de septiembre de 2002 Aceptado: 21 de enero de 2003

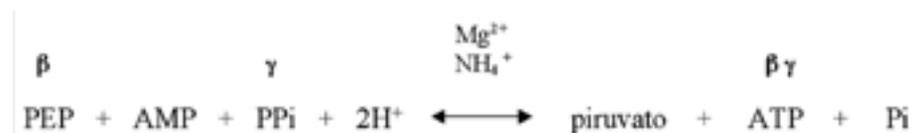


Figura 1. Reacción catalizada por la PPDK. PEP: fosfoenolpiruvato; PPi: pirofosfato; Pi: fosfato; β : fosfato β del ATP; γ : fosfato γ del ATP.

1). Reeves *et al.* (1) observaron también que no había incorporación de marca al PEP a partir de fosfato marcado (^{32}Pi), lo cual indica que el PEP se sintetiza a partir del ATP y no por la transferencia del fosfato libre al piruvato. Estudios sobre el equilibrio de la reacción utilizando la PPDK de *C. symbiosum* mostraron que la constante de equilibrio varía directamente con el cuadrado de la concentración del ión hidrógeno (Fig. 1). La participación de dos iones hidrógeno en la reacción en el sentido de la síntesis de ATP requiere que los cuatro protones del PPi estén disociados, lo cual sugiere fuertemente que la especie reactiva es el Mg^{2+}PPi (1). La reacción catalizada por la PPDK sólo puede llevarse a cabo en presencia de

Mg^{2+} . En la figura 1 se muestra que la reacción catalizada por la PPDK también requiere de cationes monovalentes para su activación, como el NH_4^+ . A la fecha no se conoce el papel que desempeña este ión, que es esencial para la mayoría de las PPDKs reportadas, con excepción de la de *E. histolytica* (13).

PROPIEDADES FÍSICAS, MOLECULARES Y ESTRUCTURALES

Se ha reportado que la masa molecular de los monómeros de la PPDK está entre 94 y 100 kDa (5, 7, 12, 13). Las PPDKs de las bacterias *Microbispora rosea* y *G. duodenalis* tienen una estructura dimérica, mientras que las de plantas tipo C_4 y *E. histolytica* son tetraméricas.

La PPDK de maíz se inactiva a

temperaturas por debajo de 10°C debido a que el tetrámero activo se disocia formando monómeros y dímeros que pueden ensamblarse nuevamente al elevar la temperatura (12, 14). La inactivación por frío es una característica común de las PPDKs de diferentes especies de plantas C_4 . Sin embargo, la velocidad de inactivación varía significativamente incluso entre organismos de la misma especie. La inactivación por frío de la enzima de maíz se evita por la presencia de Mg^{2+} , así como por la unión de piruvato o PEP (14). Resultados obtenidos con mutantes tolerantes al frío de la PPDK de *Flaveria brownii* sugieren que los aminoácidos involucrados en esta tolerancia están directa o indirectamente relacionados con la asociación de subunidades y están localizados en el extremo C-terminal (14). Con respecto a otras PPDKs se determinó que las de *P. shermanii*, *Flaveria pringlei*, *E. histolytica* y parcialmente la de *C. symbiosum* son sensibles al frío, en tanto que las PPDKs de *M. rosea* y *F. brownii* son tolerantes (5, 14).

Actualmente se conoce la estructura cristalográfica de las PPDKs de *C. symbiosum* (15) y *T. brucei* (16) con una resolución de 2.3 \AA y 3 \AA respectivamente. El cristal de la PPDK de *C. symbiosum* reveló una molécula de tres dominios plegados independientemente que corresponden a cada uno de los dominios funcionales identificados bioquímicamente (Fig. 2). El dominio C-terminal tiene una conformación de barril α/β que contiene el sitio de unión del par PEP / piruvato. A 45 \AA de distancia de este sitio se encuentra el dominio N-terminal con los sitios de unión para AMP / ATP y PPi / Pi. El tercer dominio está entre los anteriormente descritos y contiene a la histidina catalítica (His 455 en la PPDK de *C. symbio-*

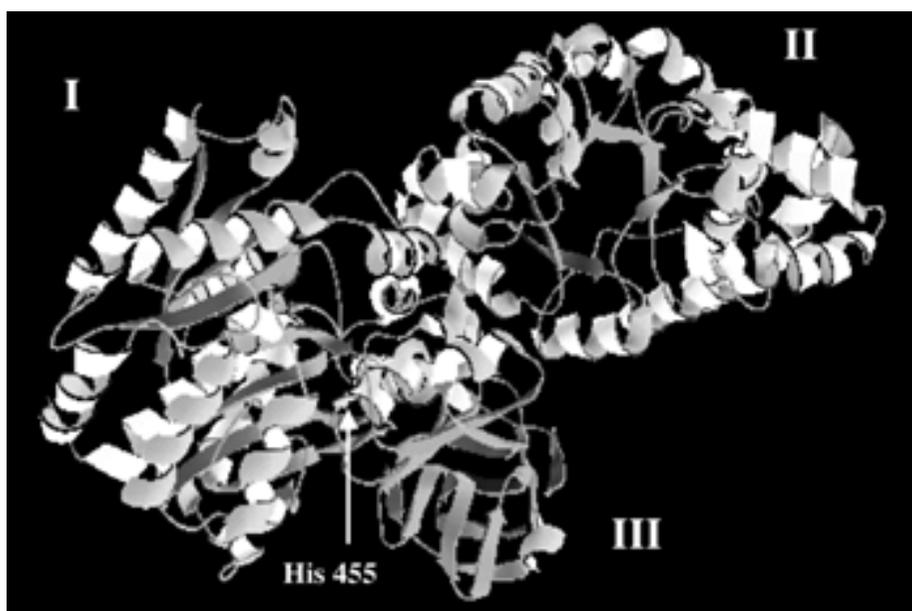


Figura 2. Estructura en modelo de listones del monómero de PPDK de *Clostridium symbiosum*. I. Dominio de unión del AMP/ATP; II. Dominio de unión del PEP/piruvato en el que se observa claramente la estructura de barril α/β ; III. Dominio de la histidina catalítica ubicada en la posición 455.

sum) responsable de la transferencia de los grupos fosfato involucrados en la reacción (15).

Para la transferencia del fosfato del ATP al piruvato, el dominio de la fosfohistidina sufre un cambio conformacional dramático, de manera que este residuo es capaz de interactuar alternativamente con los sustratos unidos al dominio amino y al carboxilo, que están separados por 45 Å de distancia (Fig. 3).

CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS

En todas las PPDKs descritas a la fecha, la relación de velocidad inicial contra la concentración de cualquiera de los sustratos sigue una cinética hiperbólica. Para la PPDK de maíz, el requerimiento por ATP no puede ser sustituido por UTP, CTP o GTP (12). La PPDK de *M. rosea* es específica para AMP, no tiene actividad en presencia de UMP, IMP, TMP, CMP y GMP (5).

En la Tabla I se enlistan los valores de las constantes de Michaelis-Menten (K_m) de los sustratos de PPDKs de diferentes organismos. El AMP es el sustrato que presenta los valores más pequeños de K_m (entre 0.85-10 μM). La mayor afinidad por AMP la tiene la PPDK de maíz (0.85-1.1 μM). En el otro extremo, el P_i es el sustrato por el que las PPDKs presentan valores de K_m más altos (0.38 - 1 mM). Los valores de K_m de las plantas C_4 son muy parecidos, pero en el caso de las PPDKs de bacterias los valores de K_m no son tan parecidos entre ellas y lo mismo pasa con los valores de los protistas parásitos (Tabla I). Estas diferencias en afinidades pueden atribuirse a la mayor diversidad de estructuras en la familia de PPDKs de los protistas parásitos y que son de un origen diferente al de las PPDKs de plantas.

La actividad de la PPDK en cualquiera de los sentidos de la reacción es dependiente de la presencia de

Mg^{2+} , ya que los verdaderos sustratos de la enzima deben estar acomplejados con este ión. Sin embargo, en el caso de la PPDK de maíz se ha sugerido que este catión divalente es también necesario para mantener a la enzima en su forma activa (11). El Mg^{2+} no puede ser sustituido por otros cationes divalentes tales como Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} en la actividad de las PPDKs de maíz (12), bacterias (1) y protistas parásitos (11), pero en *M. rosea* se preserva un 28% de la actividad en presencia de Mn^{2+} y un 53% en presencia de Co^{2+} (5). El intervalo de concentración óptimo de Mg^{2+} total es de 2 - 5 mM para las diferentes PPDKs.

Los cationes monovalentes tales como NH_4^+ o K^+ también son indispensables para la catálisis de algunas PPDKs como la de maíz (12), *C. symbiosum* (2) y *G. lamblia* (6); sin embargo, la actividad de la

PPDK de *E. histolytica* es independiente de estos iones (13). Aún no se sabe cuál es el mecanismo de activación por los iones NH_4^+ y K^+ de la PPDK, pero se ha descartado que la carga de este catión tenga un papel similar a la del K^+ esencial en algunas piruvato cinasas (PK), ya que en el cristal de *C. symbiosum* se observa un aminoácido cargado positivamente en la posición equivalente a la que ocupa este ión en la PK (15).

El pH óptimo de la reacción en sentido de la síntesis de PEP se encuentra en el intervalo de 8.0 - 8.5 (11) y para la reacción en sentido de formación de ATP es 6.3 - 7 (2, 5, 13).

Se han reportado dos mecanismos cinéticos diferentes para la PPDK (Fig. 4). Se determinó un mecanismo cinético Tri Uni Uni ping pong no clásico (TUU) para la PPDK de *P.*

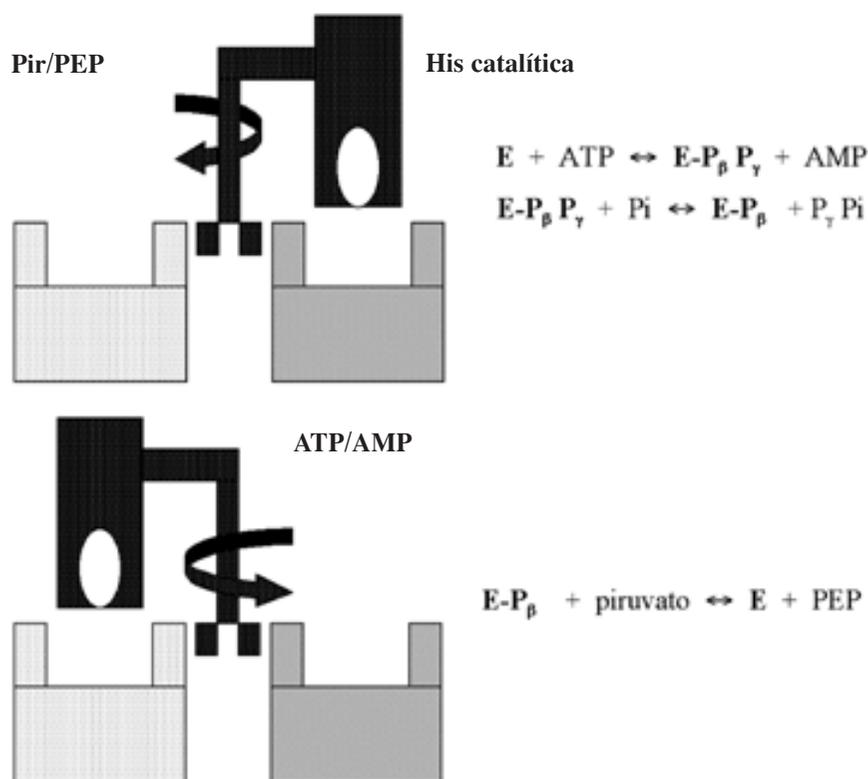


Figura 3. Modelo simplificado de los dos estados conformacionales de la PPDK de *Clostridium symbiosum* incluyendo las reacciones parciales asociadas con cada uno de ellos. ■ Dominio del ATP/AMP, □ Dominio del piruvato/PEP, ■ Dominio de la His catalítica. ○ His catalítica.

Shermanii y Bi Bi Uni Uni ping pong (BBUU) para las PPDKs de plantas C_4 y *C. symbiosum*. Las principales diferencias entre estos mecanismos residen en que en el mecanismo TUU son tres reacciones parciales las involucradas en la síntesis de ATP o PEP (Fig. 4 A), mientras que en el BUU son sólo dos reacciones parciales (Fig. 3 y 4 B). Esto se debe a que la reacción parcial entre AMP-PPi y ATP-Pi es ping pong en el caso del TUU y secuencial en el caso del BBUU. En el mecanismo BBUU el intercambio Pi-PPi requiere de ATP y AMP y el intercambio ATP-AMP se acelera varias veces en presencia de Pi-PPi, lo que indica que estos sustratos participan en una sola reacción parcial.

PAPEL METABÓLICO DE LA PPDK

El papel fisiológico de la PPDK depende del organismo en el que se encuentre. Por ejemplo, en las plantas C_4 desempeña un papel fundamental en la síntesis de PEP, que es la molécula aceptora del CO_2 atmosférico. Sin embargo, en organismos parásitos se desconoce aún su papel metabólico.

La PPDK es capaz de catalizar la reacción en cualquiera de los dos sentidos, dependiendo de condiciones tales como el pH, las concentraciones de sustratos y productos, entre otros factores. Termodinámicamente, la reacción en el sentido de la síntesis de ATP se favorece a pH 7 y la síntesis de PEP requiere de valores de pH mayores, como 8, que es el que hay dentro del cloroplasto de las células especializadas de las plantas C_4 . Hasta ahora, sólo se ha determinado la constante de equilibrio para la conversión de ATP, Pi y piruvato a AMP, PPi y PEP a pH 7 y 25°C utilizando la PPDK de *C. symbiosum* para catalizar la reacción. Se utilizó [^{14}C]piruvato y se midió la relación [^{14}C]piruvato/[^{14}C]fosfoe-

no/piruvato en el equilibrio. Se calculó que la $K_{eq}(obs)=[AMP][PPi][PEP] / [ATP][Pi][piruvato]$ es 0.003 (17). En los siguientes apartados se trata de manera particular y con mayor profundidad el papel metabólico de la PPDK.

SÍNTESIS FISIOLÓGICA DE PEP CATALIZADA POR LA PPDK

En plantas C_4 , la PPDK cataliza la reacción en el sentido de la síntesis de PEP. Para asegurar que la reacción catalizada por la PPDK se lleve a cabo en este sentido, se acopla con altos niveles de adenilato cinasa y pirofosfatasa que disminuyen los niveles de AMP y PPi respectivamente. La fotosíntesis de plantas C_4 depende de la presencia de dos tipos de células fotosintéticas que anatómicamente y bioquímicamente son muy particulares, éstas son las células del mesófilo (superficie de la hoja) y las células de la vaina, adyacentes al tejido vascular (Fig. 5 A). La PPDK se localiza en el cloroplasto de las células del mesófilo en donde el pH es 8. La PPDK sintetiza PEP en este compartimento y después este metabolito se transporta al citosol con el fin de que el CO_2 atmosférico sea fijado por

carboxilación mediante la PEP carboxilasa. Esto produce ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos como el oxaloacetato, que luego es convertido a malato por la malato deshidrogenasa dependiente de NADP. El malato es transportado a las células de la vaina y es descarboxilado en el cloroplasto de estas células por una de tres diferentes enzimas, según el tipo de planta: enzima málica dependiente de NADP, enzima málica dependiente de NAD o la PEP carboxicinas. El piruvato formado por la acción de la enzima málica lo utiliza la PPDK para regenerar el PEP aceptor del CO_2 atmosférico y así comenzar de nuevo el ciclo C_4 (Fig. 5 A).

El ciclo C_4 actúa con el fin de concentrar CO_2 en las células de la vaina, donde se encuentra localizada de manera exclusiva la vía reductora de pentosas fosfato. Debido a la alta concentración de CO_2 en estas células, la reacción de oxigenasa de la ribulosa-bisfosfato carboxilasa (rubisco) se suprime, y en consecuencia, la fotorrespiración es despreciablemente baja. Esto permite que estas plantas fotosinteticen con una conductancia estomatal reducida y en consecuencia tengan una al-

TABLA I

Constantes de Michaelis-Menten de los sustratos de la PPDK de diferentes organismos (μM)

Organismo	AMP	PPi	PEP	ATP	Pir*	Pi	Ref.**
<i>P. shermanii</i>	15	120	36	43	100	1000	(5)
<i>C. symbiosum</i>	3.5	100	60	100	80	600	(5)
<i>M. rosea</i>	5	38	280	200	130	-	(5)
<i>G. lamblia</i>	5	29	24	-	-	-	(5)
<i>E. histolytica</i>	<5	100	21	-	-	-	(13)
<i>E. histolytica</i>	<10	100	70	-	-	-	(1)
<i>Saccharum officinarum</i>	<4	40	110	90	110	500	(5)
<i>Zea mays</i> pH 8.0	1.1	40	110	31	95	380	(11)

* Piruvato, ** Referencia

ta eficiencia en la utilización de agua (12). El ciclo C_4 solamente se lleva a cabo durante el día, por lo que las enzimas que forman parte de éste también deben estar reguladas. La actividad de la PPDK de maíz es regulada por la activación de la proteína reguladora de la PPDK (PDRP); la PDRP es activa durante los períodos de luz e inactiva en la oscuridad. La PPDK de maíz tiene una regulación covalente mediada por la PDRP. La inactivación de la PPDK es el resultado de la fosforilación dependiente de ADP de un residuo de treonina altamente conservado y vecino de la histidina catalítica; la inactivación ocurre sobre la forma catalíticamente fosforilada (en la histidina catalítica 389) de la PPDK. El proceso de reactivación involucra la desfosforilación fosforolítica del residuo de Thr, dando lugar al PPI; la activación ocurre más rápidamente con la PPDK no fosforilada en la His catalítica (Fig. 5 B). La velocidad de inactivación de esta enzima depende de los niveles de ADP, así como de su estado de fosforilación, lo cual está directamente influenciado por los cocientes ATP / AMP y piruvato / PEP y por factores ambientales tales como la temperatura.

En las plantas crasuláceas con

metabolismo ácido (CAM) la PPDK también participa de manera importante, ya que es la responsable de la síntesis del aceptor primario del CO_2 atmosférico. Las plantas CAM, como las C_4 , fijan CO_2 atmosférico y lo concentran para saturar a la rubisco y reducir al mínimo la fotorrespiración. A diferencia de las plantas C_4 , las CAM llevan a cabo los ciclos C_3 y C_4 dentro de la misma célula, pero están separados temporalmente. Fijan CO_2 por la noche y lo re-asimilan por el día, con lo que el uso del agua es tan eficiente como en las plantas C_4 .

Como se acaba de exponer, la PPDK tiene un papel importante en la fotosíntesis de las plantas C_4 y CAM; sin embargo, no se conoce su función en hojas de las plantas C_3 o en las intermedias C_3-C_4 . En este tipo de plantas se destaca la presencia de una PPDK citosólica, mientras que en el caso de las plantas C_4 es exclusivamente cloroplástica. Se sabe que en raíces de arroz la expresión de la PPDK citosólica se incrementa frente a situaciones de estrés, tales como baja en la concentración de oxígeno o en situaciones de déficit hídrico (8). También se sabe que la planta intermedia C_3-C_4 *Eleocharis vivipara* es capaz de adoptar un

metabolismo de tipo C_4 bajo condiciones terrestres y C_3 en condiciones acuáticas. Es de suponerse que el desarrollo de la fotosíntesis C_4 en este organismo requiere la presencia de PPDK que sintetice PEP en el cloroplasto. En esta planta, además de una PPDK cloroplástica, existe una PPDK citosólica, pero lo novedoso es que la enzima se encuentra en las raíces, mientras que en las plantas C_4 la PPDK se encuentra exclusivamente en las hojas (10).

Las propionibacterias, como *P. shermanii*, son capaces de crecer con lactato y piruvato como fuente de carbono debido a que pueden convertir piruvato a PEP, que es necesario para la formación de compuestos de 4 carbonos, carbohidratos, glicerol y otros componentes celulares. Esta conversión no ocurre a través de la descarboxilación del oxaloacetato, ni por la reacción reversa de la PK, ni por la actividad de la PEP sintetasa, sino que es catalizada por la PPDK. La actividad de esta enzima se induce hasta 10 veces más en las bacterias cultivadas en lactato en vez de glicerol, posiblemente debido a que la PPDK es esencial para la formación de PEP a partir de lactato (2). También se ha observado una inducción de PPDK en el actinomicete termófilo *M. rosea* cultivado en lactato o piruvato, en contraste con la baja actividad de esta enzima cuando se le cultiva en presencia de maltosa o glucosa (5). Esto sugiere que, *in vivo*, la PPDK cataliza la síntesis de PEP en este organismo.

SÍNTESIS FISIOLÓGICA DE ATP CATALIZADA POR LA PPDK

Debido a la ausencia de PK en prokistas sin mitocondrias como *E. histolytica*, se ha sugerido que la PPDK sustituye la función de esa enzima para la síntesis de ATP. Sin embargo, recientemente se reportó la presencia

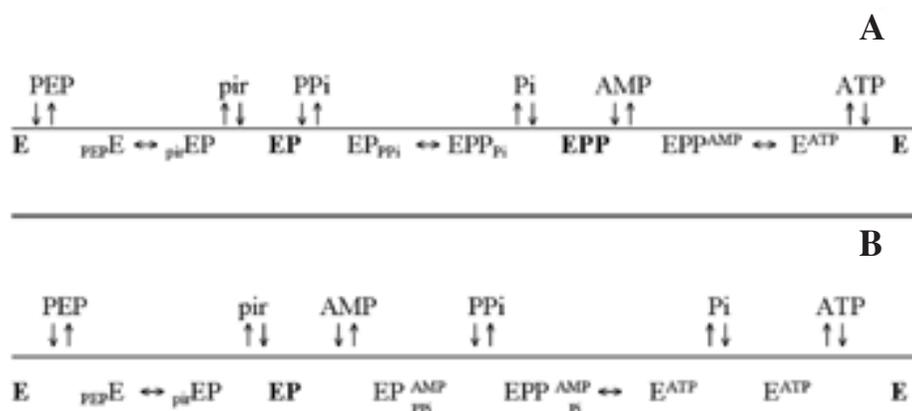


Figura 4. Esquemas de Cleland de los mecanismos cinéticos reportados para la PPDK. A. Mecanismo tri uni uni ping pong (TUU) de la PPDK de *P. shermanii*, B. Mecanismo bi bi uni uni (BBUU) ping pong de las PPDKs de plantas C_4 y *Clostridium symbiosum*.

de PK en *G. intestinalis* (18). Esto pone en duda la función atribuida a la PPK en estos protistas. Park *et al.* (18) señalan que la PK y la PPK de *G. intestinalis* trabajan en el sentido de la síntesis de ATP, ya que la PPK no puede actuar en el sentido opuesto porque no se ha reportado gluconeogénesis en este parásito. Por otra parte, las contribuciones relativas de la PK y la PPK a la glucólisis son inciertas (18). Por otra parte, debido a que la concentración de PPi en *G. intestinalis* y *E. histolytica* es alta y ambos carecen de pirofosfatasa inorgánicas, se ha propuesto que la PPK puede constituir una ruta alternativa para la utilización del PPi y de esta manera incrementar el rendimiento de ATP. La PPK de *G. intestinalis* pudiera estar involucrada, junto con la adenilato cinasa, en mantener el equilibrio entre adenín nucleótidos que son consumidos o formados por transferencias de energía (18). Todos estos resultados hacen necesario evaluar con mucho más detalle el papel metabólico de la PPK en estos parásitos.

En *T. brucei*, al igual que en *G. intestinalis* y *P. shermanii*, hay actividad tanto de PK como de PPK. En los tripanosomátidos estas dos enzimas se encuentran en distintos compartimentos subcelulares: la PPK es glicosomal y la PK es citosólica (7, 13). En el glicosoma no se ha encontrado actividad de pirofosfatasa, y hay producción de PPi a partir de vías metabólicas tales como la síntesis de purinas y pirimidinas y la β -oxidación. Por lo tanto, se ha sugerido que la PPK pudiera estar utilizando el PPi glicosomal para sintetizar ATP. Por otra parte, se ha observado que en el estadio de tripomastigote de *T. brucei* (forma alargada presente en el torrente sanguíneo de vertebrados) no existe actividad de PPK y tampoco hay actividad mitocondrial. Los autores sugieren

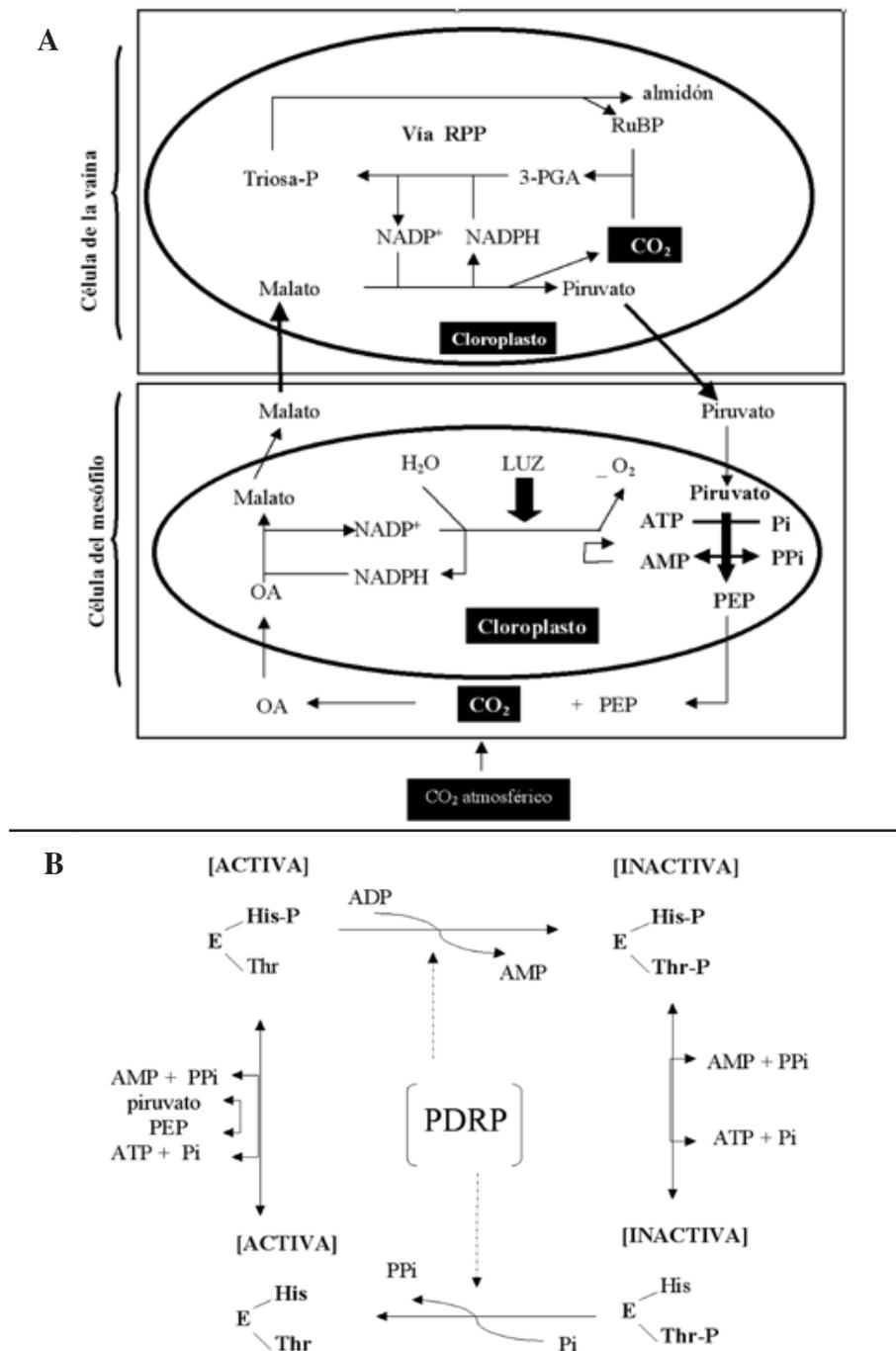


Figura 5. A) Esquema de la vía fotosintética del subgrupo de plantas C_4 que contienen a la enzima málica dependiente de NADP, en el que se resalta el papel de la PPK en el cloroplasto de la célula del mesófilo. RPP: vía reductora de las pentosas fosfato; RuBP: ribulosa 1,5-bisfosfato; 3-PGA: 3-fosfoglicerato; OA: oxaloacetato. B) Modelo del mecanismo de inactivación mediada por ADP y activación mediada por Pi de la piruvato fosfato dicinasa por acción de la PDRP. Estas reacciones se cree que son responsables de la regulación de la PPK mediada por los periodos luz-oscuridad en hojas de plantas C_4 . E His: PPK; E His-P: PPK fosforilada en la His catalítica; E His-P y E His: representan formas inactivadas de la enzima por fosforilación del residuo de Thr. (tomado de referencial2).

que la función de la PPK esté asociada indirectamente con alguna función mitocondrial (síntesis de

ATP) en otro estadio del parásito. Los tripomastigotes del torrente sanguíneo expulsan todo el piruvato

producido aeróbicamente, mientras que en otros estadios el PEP es dirigido nuevamente al glicosoma para la formación de L-malato, que es luego reducido a succinato. Por lo tanto, la PPDK podría sintetizar PEP en el glicosoma a partir del piruvato citosólico para luego ser reducido a L-malato. Esto se ve apoyado por la evidencia de que se ha encontrado actividad de una enzima glicosomal requerida para la producción de L-malato, la PEP carboxicinaasa, que está presente en todas las formas de vida del parásito, con excepción del tripomastigote (7).

A la fecha no existen estudios que demuestren contundentemente el papel que juega la PPDK en el metabolismo de los protistas parásitos mencionados en esta última sec-

ción, y todo lo que pueda decirse de la participación metabólica de esta enzima es mera especulación. Sin embargo, los estudios a este respecto son necesarios y serían muy útiles, no solamente por el conocimiento básico que se genere, sino también porque esta enzima no está presente en el humano y, en consecuencia, constituye un blanco potencial para el diseño de fármacos en contra de estos parásitos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se ha generado mucho conocimiento sobre la PPDK con respecto a aspectos tales como el cinético, bioquímico, metabólico e incluso regulatorio en el caso de las plantas C_4 y *C. symbiosum*. Sin embargo, en el caso de la PPDK de protistas pará-

sitos o de otro tipo de plantas tales como las C_3 o las intermedias C_3 - C_4 se sabe muy poco. En la mayoría de los casos solamente se tiene una caracterización enzimática muy básica, pero algo tan importante como el papel metabólico que desempeña la PPDK en protistas parásitos no está científicamente documentado. Debido a que esta enzima se ha propuesto como candidato para el diseño de fármacos por su ausencia en el ser humano, es necesario investigar a fondo la importancia metabólica de ésta en cada uno de los parásitos que la poseen con el fin de establecer si verdaderamente constituye un buen blanco para combatir enfermedades tales como la amibiasis, giardiasis, tripanosomiasis y leishmaniasis, entre otras. 

REFERENCIAS

1. Reeves E R, Menzies A R y Hsu S D (1968) The Pyruvate-Phosphate Dikinase Reaction. *J Biol Chem* 243: 5486-5491.
2. Evans J H y Wood G H (1968) The mechanism of the pyruvate, phosphate dikinase reaction. *Biochemistry* 61: 1448-1453.
3. Reeves E R (1968) A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 243: 3202-3204.
4. Hatch M D y Slack C R (1968) A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphoenolpyruvate and its role in the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem J* 106: 141-146
5. Eisaki N, Tatsumi H, Murakami S y Horiuchi T (1999) Pyruvate phosphate dikinase from a thermophilic actinomyces *Microbispora rosea* subsp. *aereata*: purification, characterization and molecular cloning of the gene. *Biochim Biophys Acta* 1431: 363-373.
6. Hiltbold A, Thomas M R y Köhler P (1999) Purification and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Giardia*. *Mol Biochem Parasitol* 104: 157-169.
7. Bringaud F, Baltz D, y Baltz T (1998) Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: Pyruvate, phosphate dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7963-7968.
8. Moons A, Valcke R y Montagu V M (1998) Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C_3 plant. *Plant Journal* 15: 89-98.
9. Rosche E y Westhoff P (1990) Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in the dicotyledonous C_4 plant *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett.* 273: 116-121.
10. Agarie S, Kai M, Takatsuji H y Ueno O (1997) Expression of C_3 and C_4 photosynthetic characteristics in the amphibious plant *Eleocharis vivipara*: structure and analysis of the expression of isogenes for pyruvate, orthophosphate dikinase. *Plant Mol Biol* 34: 363-369.
11. Maldonado R A y Fairlamb A H (2001) Cloning of a pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 112: 183-191.

12. Edwards E G y Nakamoto H (1985) Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C₄ photosynthesis: properties and mechanism of light/dark regulation. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 255-286.
13. Saavedra-Lira E y Pérez-Montfort R (1998) Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1382: 47-54.
14. Ohta S, Usami S, Ueki J, Kumashiro T, Komari T y Burnell N J (1997) Identification of the amino acid residues responsible for cold tolerance in *Flaveria brownii* pyruvate, orthophosphate dikinase. *FEBS Lett* 403: 5-9.
15. Herzberg O, Chen C, Kapadia G, McGuire M, Carroll J L, Noh J S y Dunaway-Mariano D (1996) Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2652-2657.
16. Cosenza LW, Bringaud F, Baltz T, Vellieux FM (2002) The 3.0 Å resolution crystal structure of glycosomal pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol.* 318: 1417-32
17. Dunaway-Mariano D (1999) Intermediates and Energetics in Pyruvate Phosphate Dikinase. *Meth Enzymol* 308: 149-177.
18. Park H J, Schofield J P y Edwards R M (1997) Pyruvate Kinase Is Present in *Giardia intestinalis*. *Exp Parasitol* 87: 153-156.

EN BUSCA DE NUEVOS FÁRMACOS CONTRA ALGUNOS TRIPANOSOMÁTIDOS*

GLORIA HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA

RESUMEN

La enfermedad del sueño, la enfermedad de chagas y la leishmaniasis son enfermedades causadas por diferentes tripanosomátidos, principalmente en países en vías de desarrollo. El diseño de inhibidores que se puedan utilizar como guías para nuevos fármacos contra estas enfermedades es actualmente de interés, tanto para grupos de investigación básica como para entidades del servicio público. Modelos matemáticos del control de flujo del metabolismo glicolítico y estudios de varias enzimas de esta vía con diversos inhibidores sugieren a la glicólisis como blanco para el diseño de un nuevo fármaco, ya que representa la fuente principal de energía para estos parásitos.

PALABRAS CLAVE: Tripanosomátido, diseño racional de fármacos, inhibidores especie-específicos, knockout de genes.

ABSTRACT

Sleeping sickness, chagas` disease and leishmaniasis are diseases caused by different trypanosomatids in developing countries. The design of new inhibitor drugs for these diseases is nowadays of particular interest for basic research groups or government agencies. A mathematical model of glycolytic flux and studies with inhibitors of different glycolytic enzymes strongly suggest that enzymes involved in glycolysis can be used as good targets for the design of new drugs, since this metabolic pathway represents the main source of energy for these parasites.

KEY WORDS: Trypanosomatid, rational drug design, species-specific inhibitor, gene knockout.

INTRODUCCIÓN

Los tripanosomátidos son un grupo de parásitos protozoarios de importancia médica y veterinaria e incluyen a *Leishmania* spp y *Trypanosoma* spp. Sus ciclos de vida son bastante complejos y consisten de cambios morfológicos dramáticos entre los estadios dentro del insecto vector y en el hospedero vertebrado. Algunos miembros del grupo son: *Trypanosoma brucei*, agente causante de la enfermedad del sueño en los humanos y nagana en el ganado dentro del continente africano, *Try-*

panosoma cruzi, que causa la enfermedad de chagas en América central y del sur, y *Leishmania* spp, que causa la leishmaniasis de tipo visceral, cutánea y mucocutánea en países tropicales (1).

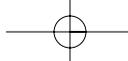
CARACTERÍSTICAS DE LAS ENFERMEDADES

La enfermedad del sueño, puede producirse por 2 especies de tripanosomas: *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *T. b. gambiense*, y se transmite al humano por el piquete de la mosca tsetse (género *Glossina*

spp). Cuando los tripanosomas se introducen en el torrente sanguíneo del hospedero, proliferan hasta invadir el sistema nervioso central y, finalmente, el estado terminal de la tripanosomiasis se manifiesta por una meningoencefalitis crónica. Existen dos categorías clínicas de la enfermedad del sueño dependiendo de qué sub-especie es la causante. El intervalo entre el inicio de la infección por *T. b. gambiense* y el estado encefalítico puede ser desde 2 hasta 8 años. En contraste, el intervalo en la infección por *T. b. rhode-*

* Recibido: 16 de octubre de 2002 Aceptado: 21 de enero de 2003

Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-242, C.P. 04510. México D.F. Tel. 5622-5657, Fax 5622-5630. Correo E: ghernan@ifisiol.unam.mx



de la respuesta inmunológica del hospedero, se debe a que contiene cerca de 1000 genes VSG. Sólo se expresa un gen VSG a la vez y, el cambio de VSG, se da en una baja frecuencia. La glicoproteína está ligada a través de su grupo carboxilo terminal a una forma glicosilada del fosfatidilinositol. De esta forma se confiere un anclaje, unión de la proteína a la membrana, y un lugar de ruptura cuando el organismo sustituye una glicoproteína de superficie por otra. Este mecanismo evoca una fuerte respuesta inmunológica, que resulta en la destrucción cíclica de la mayor parte de la población de tripanosomas (3). Sin embargo, poblaciones menores, que han cambiado su VSG, sobreviven y se reproducen, repitiéndose el ciclo.

FÁRMACOS

Existen muy pocos fármacos contra los tripanosomátidos de los cuales la mayoría producen graves efectos colaterales. Además para algunos de estos fármacos ya se han encontrado cepas resistentes (4). Uno de los fármacos más usados contra *T. brucei* es la pentamidina. Se utiliza en las fases tempranas de la infección, con resultados satisfactorios en la mayoría de los casos; sin embargo, el pronóstico no es bueno cuando el parásito ya ha invadido el sistema nervioso central. El melarsoprol se utiliza en las fases tardías de la enfermedad, pero presenta efectos secundarios que pueden ser fatales. La eflornitina, el fármaco más reciente, tiene efectos graves. Generalmente el tratamiento consiste en administrarlo intravenosamente en grandes cantidades a pacientes hospitalizados (5). El suramin se ha utilizado como medicamento para la enfermedad del sueño en las fases iniciales durante los últimos 70 años y los efectos secundarios que produce generalmente son graves. Para la en-

fermedad de chagas se utilizan como fármacos el nifurtimox y el benznidazole. Con ellos se puede curar hasta el 90 % de los casos durante la fase aguda, pero no tienen ningún efecto en pacientes que desarrollaron la fase crónica. Lamentablemente ambos fármacos también producen graves efectos colaterales y se ha sugerido que pueden causar neoplasias (6). Para la leishmaniasis se utilizan con poco éxito la pentamidina y la paramomicina. El medicamento principal es la anfotericina B, el cual aunque es altamente activo, también es muy tóxico y sumamente caro (2). Considerando este panorama, existe la necesidad de diseñar fármacos más efectivos y menos tóxicos contra este tipo de enfermedades.

DISEÑO DE FÁRMACOS BASADO EN LA ESTRUCTURA

Algunas investigaciones consideran que el diseño de fármacos basado en la estructura de proteínas, para el tratamiento de estas enfermedades tiene

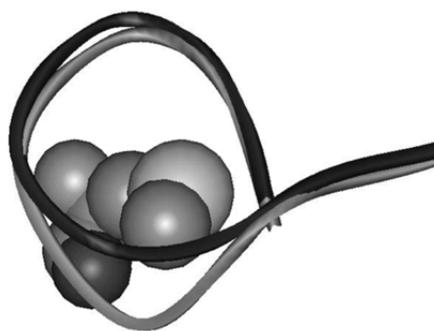
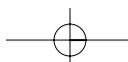


Figura 2. Se muestra una sobreposición del asa 3 de la TIM de humano (en gris) y de *T. cruzi* (en negro) alrededor de la metionina 15 del otro monómero de la TIM de humano. Se puede observar la mayor amplitud del asa 3 de la enzima de humano con respecto a la del tripanosoma, lo que concuerda con el mayor espacio ocupado por la cadena lateral de la metionina con respecto al ocupado por la cadena lateral de la cisteína. Las coordenadas cristalográficas se obtuvieron de los archivos del PDB 1HTI (para la TIM de humano) y 1TCD (para la TIM de *T. cruzi*).

grandes probabilidades de éxito (7). Este método se basa en diseñar fármacos utilizando la estructura tridimensional de proteínas blanco. La estrategia consiste en buscar sistemáticamente moléculas capaces de unirse con alta selectividad a las proteínas blanco mediante simulaciones virtuales. Después de encontrar uno o varios compuestos que se unen a la proteína blanco, se proponen variaciones estructurales de los mismos tratando de encontrar nuevos compuestos que, de acuerdo al modelado computacional, podrían presentar una afinidad más selectiva por la proteína. El siguiente paso es sintetizarlos o adquirirlos comercialmente y probarlos *in vitro*. En un ejemplo reciente, por medio de estudios comparativos entre las estructuras cristalográficas de las enzimas gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de humano y de tripanosomas, fue posible diseñar un inhibidor de alta afinidad: la N⁶-(1-naftalenometil)-2'-(3-clorobenzamido) adenosina, contra la GAPDH tripanosomal. El sitio de unión para el grupo adenosina del NAD⁺, muestra grandes diferencias entre las enzimas del parásito y de humano. Notablemente, en la GAPDH del parásito existe una hendidura hidrofóbica adyacente al hidroxilo-2' de la ribosa de la adenosina. Esta hendidura no existe en la enzima del humano, lo que permitió diseñar dicho inhibidor, mismo que tuvo una IC₅₀ de 0.3 μM. Dicho compuesto es capaz de inhibir el crecimiento de cultivos de *T. brucei*, promastigotes de *Leishmania* y amastigotes de *T. cruzi* a concentraciones micromolares, sin afectar el crecimiento de fibroblastos humanos (8).

INHIBICIÓN DE LA VÍA GLUCOLÍTICA EN TRIPANOSOMAS

Se ha demostrado que la interrupción de la vía glucolítica en tripanosomas permite la eliminación del



parásito (9). En el torrente sanguíneo de los mamíferos las mitocondrias de *T. brucei* no son funcionales y su única fuente de energía proviene del catabolismo de la glucosa. En ese caso *T. brucei* depende exclusivamente de la glucólisis para generar el ATP requerido para su proliferación y maduración celular (10). *T. cruzi* se multiplica en el interior de las células que invade, y sus mitocondrias se encuentran funcionales durante todo su ciclo de vida. A pesar de que *T. cruzi* consume 10 veces menos glucosa en comparación con *T. brucei*, se ha determinado que la utilización de la glucosa es la vía metabólica preferida de este parásito. Es por ello que se piensa que una estrategia adecuada para resolver una infección por estos parásitos es bloquear una o más de las enzimas de la glucólisis, para impedir la generación de energía que los tripanosomas necesitan para su sobrevivencia (1, 11) (Fig. 1).

En 1997 Bakker y colaboradores (12) propusieron un modelo matemático del control de flujo del metabolismo glicolítico en *T. brucei*. Utilizaron los datos experimentales de las constantes cinéticas y de equilibrio de las enzimas de la vía glicolítica para alimentar el modelo. Con él pudieron predecir la contribución de las enzimas del metabolismo glicolítico al control de flujo, aún cuando en él las condiciones aerobias y anaerobias sean diferentes. Basándose en este mismo modelo, Eisenthal y Cornish-Bowden en 1998 (13) modelaron la inhibición de las enzimas de la glicólisis. Su estudio llegó a la conclusión de que para lograr dicha inhibición usando un inhibidor competitivo, sólo se puede emplear al transportador de piruvato como blanco. Esto se debe a que el piruvato producido por *T. brucei* en su forma sanguínea se excreta al torrente sanguíneo del hos-

pedero junto con un protón, mediante un acarreador de difusión facilitada tipo simporte. Este acarreador es necesario para la regulación del pH intracelular. La inhibición del transporte produciría acumulación de piruvato dentro del tripanosoma y por lo tanto, acidificación del citosol. Esto como consecuencia produciría la muerte del tripanosoma por desestabilización osmótica. En cambio con un inhibidor no-competitivo e irreversible, es decir, con una inhibición del 100 % de la glucólisis, cualquier enzima de la vía glicolítica se puede utilizar como blanco potencial para el diseño de fármacos.

INHIBIDORES ESPECIE-ESPECÍFICOS

Se han planteado otras estrategias en el diseño racional de fármacos. Algunas investigaciones se enfocan sobre enzimas que solo existen en el parásito (9), mientras que otros trabajos intentan producir inhibidores dirigidos contra el sitio activo de enzimas que existen tanto en el parásito como en el hospedero (14). Esta última estrategia es difícil porque el sitio activo de una enzima generalmente está altamente conservado, aún en especies muy separadas por la evolución. El problema también se ha abordado tratando de diseñar inhibidores especie-específicos de enzimas. La hipótesis de esta estrategia plantea que es necesario identifi-

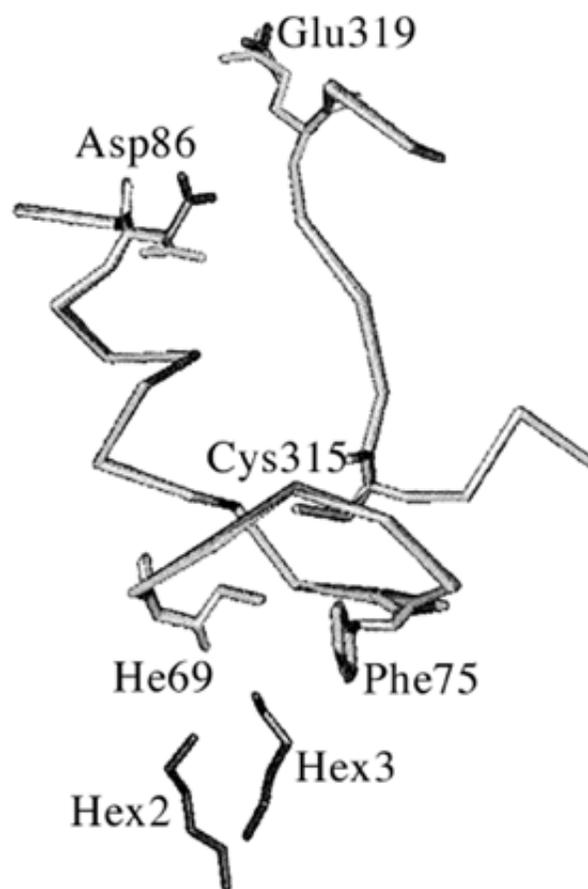


Figura 3. Posición de dos hexanos (Hex2 y Hex3) en la estructura de cristal de *T. cruzi* en la región cercana a la cisteína 15 de la interfase (Cys 315) (tomado de la referencia 15).

car un aminoácido no conservado que sea importante para la función y estabilidad de la enzima de una especie en particular. Un agente que modifique a tal residuo podría inhibir la función de la enzima de esta especie, teniendo poco o ningún efecto sobre la actividad de la enzima homóloga de otras especies que posean un residuo diferente en esta posición (11). La enzima glicolítica con la que se está probando dicha hipótesis es la triosafosfato isomerasa (TIM) (en la figura 1 ver la reacción que cataliza). La TIM es una enzima dimérica, con una estructura de barril α/β . Se cuenta con la estructura cristalográfica de la TIM de por lo menos 12 especies (entre ellas las de 5 parásitos) y se conoce con gran detalle su

mecanismo de reacción. Una parte de la enzima lo constituye la región de la interfase entre ambos monómeros, formada por 32 residuos (del asa 1 al asa 4). Dicha región es importante para la estabilidad del dímero. Se ha propuesto un aminoácido no conservado, el residuo 14 de la región de la interfase, que se encuentra en el asa 1, como blanco para el diseño de inhibidores especie-específicos. Del análisis de secuencias de aminoácidos de diferentes TIMs se ha postulado a la cisteína 14 (residuo que poseen principalmente tripanosomátidos) como un sitio estratégico de inhibición. Mediante el uso de derivatizantes de grupos sulfhidrilo Gómez-Puyou y col (11) lograron inhibir la actividad de las TIMs de diferentes tripanosomátidos. Sin embargo, bajo las mismas condiciones la actividad de la TIM de humano, cuyo residuo en la posición 14 está ocupado por una metionina, no se inhibió. Otra diferencia entre las enzimas de ambas especies es la región del asa 3 que rodea al residuo en la posición 14. Dicha diferencia consiste en que el asa 3 es más larga para la TIM de humano (treonina 72) que la de los tripanosomátidos (Fig. 2). Por otra parte, la importancia del asa 3 y el residuo 14 para la estabilidad del dímero se han estudiado en gran detalle. En estudios de la estructura cristalográfica de la TIM de *T. cruzi* en solventes orgánicos (método que permite identificar sitios de unión de moléculas orgánicas hidrofóbicas, mismos que pueden representar regiones a donde pueden llegar a interactuar fármacos) se encontraron dos moléculas de hexano localizadas a menos de 4 Å de los residuos isoleucina 69 y fenilalanina 75 la región de la interfase del dímero de un monómero, estos dos residuos rodean a la cisteína 15 del otro monómero (Fig. 3), marcada como Cys315. La cercanía de los dos he-

xanos a la región de la interfase confirma aún más el interés de esa cisteína como blanco potencial para el diseño de fármacos (15).

“KNOCKOUT” DE GENES

El “knockout” de genes es un método utilizado para investigar directamente la importancia y función de un gen. Se puede utilizar para averiguar si un gen es esencial para la supervivencia de una célula y posteriormente utilizar su producto como blanco para el diseño de fármacos. En años recientes se ha estudiado la posibilidad de usar el “knockout” de genes en tripanosomátidos; algunos de estos estudios se han realizado principalmente durante el crecimiento de parásitos en condiciones de cultivo. Un ejemplo de un gen que no es requerido en un estado del ciclo de vida, pero que es esencial en otro, es el de una Map cinasa de *Leishmania mexicana* que participa en la señalización celular. Los promastigotes mutantes y carentes de Map cinasa son viables y fenotípicamente similares al silvestre. Sin embargo, son incapaces de infectar macrófagos, lo que implica que el gen es esencial para la sobrevivencia del parásito en el hospedero. Esta Map cinasa es un blanco prometedor para el diseño de fármacos específicos contra el parásito, siempre y cuando no se afecte la enzima del hospedero mamífero.

La enzima ornitina descarboxilasa (ODC) de *T. brucei* es inhibida por el inhibidor D, L- α -difluoro metil ornitina. Este fármaco se usa clínicamente en la enfermedad del sueño causada por *T. b. gambiense*. La ODC esta involucrada en los primeros pasos de la biosíntesis de poliaminas, pero su inhibición en este paso puede ser eludida por la presencia de altas concentraciones de poliamina exógena. Con respecto a esto ya se tienen mutantes nulas de ODC en

T. brucei. En estas mutantes, carentes de poliaminas, se produce citostasis y, finalmente, los parásitos mueren. Así se ha demostrado que la falta de ODC es letal *in vitro* bajo las condiciones estudiadas (16).

LIMITACIONES PARA LA INTRODUCCIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS

Los criterios para permitir la introducción de un nuevo compuesto al mercado farmacéutico son sumamente estrictos y difíciles de llenar y esta es la principal razón por la cual la mayoría de los compuestos con actividad farmacológica nunca llegan a convertirse en fármacos útiles. La identificación y las pruebas clínicas de un nuevo fármaco llevan un promedio de 12 años o más (17). Es por eso que un acercamiento racional hacia el descubrimiento de fármacos es atractivo para las compañías farmacéuticas debido a que promete acelerar este proceso. Un hecho desafortunado, es la falta de interés de las compañías farmacéuticas por las enfermedades parasitarias más predominantes en el tercer mundo. La razón económica de esta situación es evidente, ya que la economía de los países en vías de desarrollo, donde estas enfermedades predominan, no puede proveer las ganancias deseadas. Es por ello que los esfuerzos por avanzar la investigación en el campo ha quedado en manos de grupos de científicos académicos y del sector público (17).

CONCLUSIÓN

La posibilidad de identificar inhibidores selectivos de enzimas de la glucólisis de tripanosomas se considera muy prometedor. Dichos inhibidores pueden ser utilizados como guías para nuevos fármacos. A pesar de que la glucólisis es una vía altamente conservada, se pueden identificar diferencias estructurales

y cinéticas en la mayoría de las enzimas tripanosomales comparadas con su equivalente en los humanos. En una gran variedad de casos estas diferencias han permitido el diseño y síntesis de inhibidores selectivos.

Algunos de estos inhibidores han bloqueado la glucólisis en los parásitos y retardado su crecimiento en cultivos sin tener efecto sobre células de mamífero. En futuras investigaciones se podrá optimizar su afi-

nidad y evaluar *in vivo* su actividad, toxicidad, dosificación, efectos carcinogénicos, mutagenicidad y farmacocinética para lograr obtener fármacos con altísima especificidad y efectos colaterales mínimos. 

REFERENCIAS

1. Verlinde C L M J, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Périé J J, Fothergill-Gilmore L A, Opperdoes F R, Gelb M H, Hol W G J y Michels P A M (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat* 4: 50-65.
2. Croft S L y Yardley V (2002) Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 8:319-342.
3. Boothroyd J C (1985) Antigenic variation in African trypanosomes. *Ann Rev Microbiol* 39: 475-502.
4. Murta S M F y Romanha A J (1998) Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benzanidazole and nifurtimox. *Parasitology* 116: 165-171.
5. Barrett M P y Fairlamb A H (1999) The biochemical Basis of arsenical-Diamide crossresistance in african trypanosomes. *Parasitol Today* 15: 136-140.
6. Bocchi E A, Higuchi M D, Viera L C, Stolf N, Belloti G, Fiorelli A, Janete A y Pileggi F (1998) Higher incidence of malignant neoplasms after heart transplantation for treatment of chronic Chagas' heart disease. *J Heart and Lung Transp* 17: 399-405.
7. Verlinde C L M J y Hol W G J (1994) Structure-based drug design: progress, results and challenges. *Structure* 2: 577-587.
8. Arnov A M, Suresh S, Buckner F S, Van Voorhis W C, Verlinde C L M J, Opperdoes F R Hol W G J y Gelb M H (1999) Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4273-4278.
9. Fairlamb A H y Cerami A (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* 46: 695-729.
10. Sommer J M y Wang C C (1994) Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 48: 105-138.
11. Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga R A, Rojo-Domínguez A, y Pérez-Montfort R (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol* 2: 847-855.
12. Bakker B M, Michels P A M, Opperdoes F R y Westerhoff H V (1997) Glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei* can be understood in terms of the kinetics of the glycolytic enzymes. *J Mol Chem* 272: 3207-3215.
13. Eisenthal R y Conish-Bowden A (1998) Prospects for antiparasitic drugs. The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of african sleeping sickness. *J Biol Chem* 273: 5500-5505.
14. Verlinde C L M J, Merritt E A, Akker V A F, Kim H, Feil I, Delboni L F, Mande S C, Sartaty S, Petra P H y Hol W G J (1994) Protein crystallography and infectious diseases. *Protein Sci* 3: 1670-1686.
15. Gao X G, Maldonado E, Pérez-Montfort R, Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómes-Puyou A, y Rodríguez-Romero A (1999) Cristal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10062-10067.
16. Barrett M P, Mottram J C y Coombs G H (1999) Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends Microbiol* 7: 82-88.
17. Hunter W H (1997) A structure-based approach to drug discovery; crystallography and implications for the development of antiparasite drugs. *Parasitology* 114: 17-29.

EL PLEGAMIENTO DE LOS PRIONES*

OSCAR FLORES-HERRERA, FEDERICO MARTÍNEZ Y JUAN PABLO PARDO

RESUMEN

Se ha sugerido que los priones causan algunas enfermedades transmisibles, genéticas y esporádicas del sistema nervioso central, entre las que se incluyen a la encefalopatía espongiforme del ganado bovino y a las enfermedades de Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Sträussler-Scheinker y el insomnio fatal familiar en los humanos. Las partículas infecciosas están compuestas por una isoforma anormal de la proteína priónica, la cual está codificada por un gene cromosomal. Un proceso postraduccional aún desconocido, convierte la proteína priónica celular en una isoforma anormal. Los estudios realizados en este tipo de enfermedades, proveen una conexión entre el plegamiento de las proteínas y las enfermedades priónicas. En este trabajo se examina el modelo termodinámico para el plegamiento de los priones, así como el mecanismo para su propagación que se ha propuesto para entender la forma infecciosa, hereditaria y esporádica de este tipo de enfermedades.

PALABRAS CLAVE: Prion, encefalopatía espongiforme, termodinámica del plegamiento de proteínas, fibras amiloideas, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstman-Straussler-Scheinker, enfermedad del Insomnio fatal familiar.

ABSTRACT

Prions cause transmissible, genetic and sporadic neurodegenerative diseases, including bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Sträussler-Scheinker and fatal familial insomnia diseases in humans. Infectious particles are composed of an abnormal isoform of the prion protein, which is encoded by a chromosomal gene. A postraductional process, as yet unidentified, converts the cellular prion protein into an abnormal isoform. The prion diseases provide a connection between protein folding and neurodegenerative diseases. In this review, thermodynamic model for prion folding is examined and the possible mechanism of prion replication to understand infectious, inherited and sporadic forms of these diseases.

KEY WORDS: Prion, bovine spongiform encephalopathy, protein folding, amyloid fibril, Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstman-Straussler-Scheinker disease, fatal familial insomnia.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades priónicas son un grupo heterogéneo de entidades nosológicas neurodegenerativas caracterizadas, aunque no exclusivamente, por tres tipos de lesiones típicas en el cerebro: la hipertrofia e hiperplasia de los astrocitos, la pérdida de las neuronas y el desarrollo

de vacuolas dentro de las células del sistema nervioso. Los signos clínicos de tales enfermedades se pueden presentar en meses, años e incluso décadas, y las lesiones cerebrales sólo son el producto final de otro proceso que involucra el producto de un único gen: el PRNP (la proteína priónica). Las disfunciones

neurológicas inducidas por los cambios en el metabolismo de la PrP pueden adquirirse por la transmisión de una partícula infecciosa (el prion), de carácter hereditario debido a la transferencia de una mutación en el gen PRNP o de carácter espontáneo, originado por un mecanismo aún desconocido (1).

* Recibido: 16 de octubre de 2002. Aceptado: 21 de enero de 2003

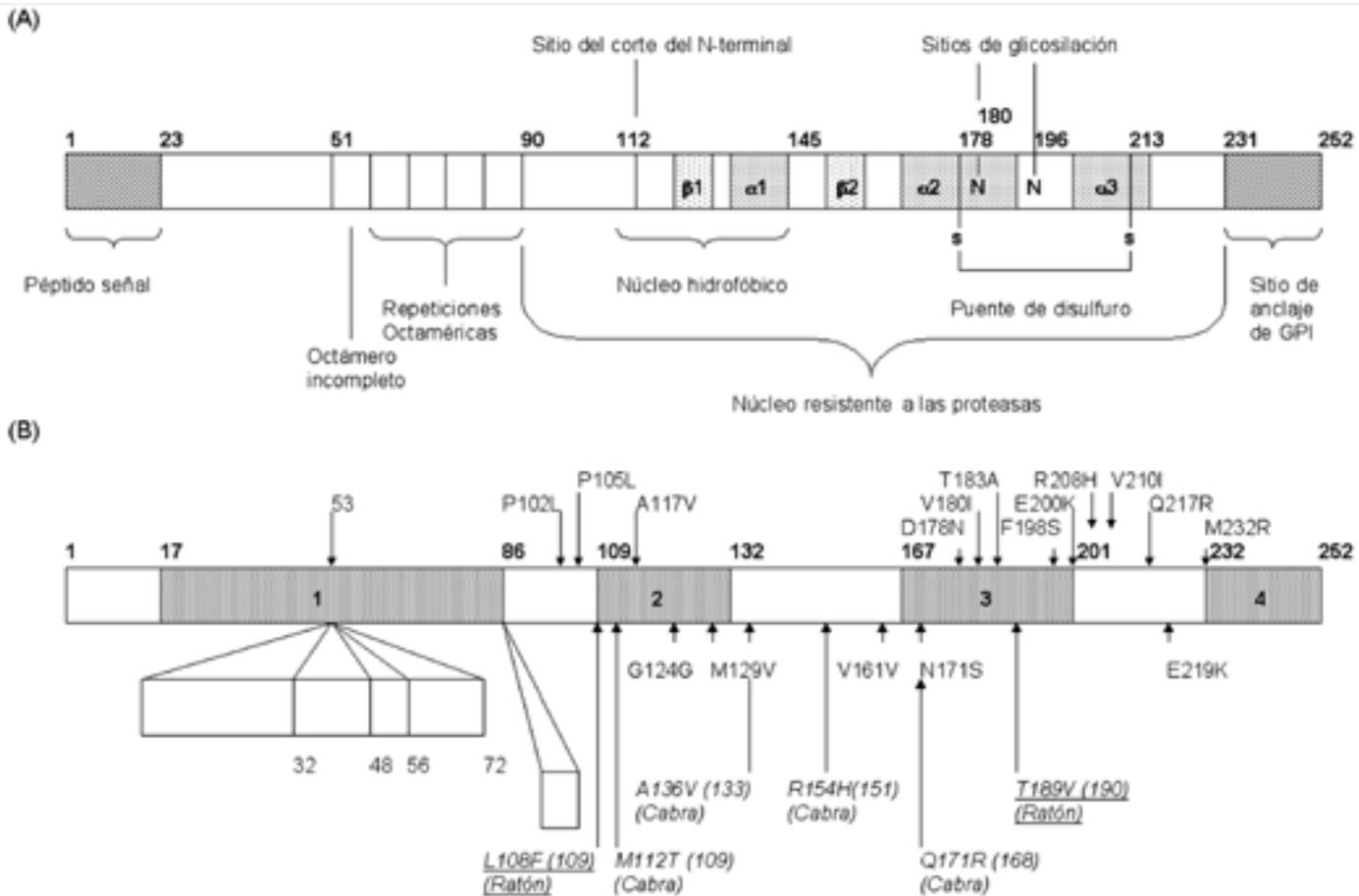


Figura 1. Estructura primaria de un prion (PrP). (A) Esta proteína está asociada a la cara externa de la membrana plasmática por medio de una anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). La glicosilación puede ocurrir en dos residuos de asparagina, y el enramado de carbohidratos puede variar dependiendo de la estirpe priónica de que se trate. En el núcleo hidrofóbico se encuentra el sitio de corte del extremo N-terminal, donde la proteína es cortada según las condiciones metabólicas. El puente de disulfuro une dos regiones de la proteína que presentan una estructura de α -hélice. Cerca del extremo N-terminal se muestran las repeticiones octaméricas, las cuales pueden unir más de cuatro átomos de cobre. Muchas proteínas priónicas de mamíferos presentan un octámero incompleto, sin embargo, se desconoce si presenta alguna función. En cuanto a la estructura secundaria, con técnicas de NMR se predice una topología $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\alpha_3$, así como el núcleo resistente a proteasas. (B) Mapa genético de las mutaciones y polimorfismos que provocan enfermedades priónicas en humanos, así como cuatro regiones altamente conservadas en los mamíferos (regiones sombreadas). Asimismo, se muestran las inserciones de 32, 48, 56 y 72 residuos de aminoácidos, de los cuales los últimos tres están asociados con el síndrome de CJ familiar. En particular, se ha podido determinar que las mutaciones puntuales en los residuos 102 (*Pro*→*Leu*), 117 (*Ala*→*Val*) y 198 (*Phe*→*Ser*) se encuentran en pacientes con el síndrome GSS. Las mutaciones puntuales en los residuos 178 (*Asp*→*Asn*) y 200 (*Glu*→*Lys*) se encuentran en pacientes con el síndrome de CJ. En letras itálicas se muestran las variantes para los priones de cabra y en letras itálicas y subrayadas, las de ratón.

PROPIEDADES GENERALES DE LOS PRIONES

La conversión de una proteína priónica común (PrP^C, el superíndice C significa celular) en una isoforma resistente a la acción de las proteasas, la PrP^{Sc} (el superíndice Sc del inglés "scrapie", escrapie en español, enfermedad neurodegenerativa que se presenta en los ovinos, 2), es el evento clave en la patogénesis de todas las enfermedades PrP trans-

misibles, donde la PrP^{Sc}, de acuerdo con la teoría priónica, es el único componente de la partícula infecciosa (1).

La proteína priónica madura tiene de 208 a 220 residuos de aminoácidos dependiendo de la especie, dos sitios de glicosilación y uno de anclaje a la membrana del tipo del glicosilfosfatidilinositol (GPI) ubicado en el extremo carboxilo terminal. En las dos terceras partes

de la proteína, hacia el extremo carboxilo terminal, hay tres α -hélices y 2 láminas β -plegadas estrechamente asociadas (Fig. 1A). Los 80 a 100 residuos de aminoácidos restantes en el extremo amino terminal, incluyendo los dominios para la fijación del cobre, adquieren una estructura muy flexible y poco definida. La isoforma PrP^{Sc}, resistente a las proteasas, carece de este segmento amino-terminal, y debido a

esto se ha sugerido que dicha región puede tener poca importancia en la transmisión de las encefalopatías; sin embargo, la isoforma PrP^{Sc} que se acumula en las afecciones cerebrales puede presentar la secuencia del extremo amino-terminal (1).

En la célula, el polipéptido PrP que se sintetiza *de novo* tiene un péptido señal de secuencia convencional que se acopla al complejo ribosoma-RNAm y al canal translocador de partículas localizado en la cara citoplásmica del retículo endoplásmico rugoso (RER) (3). En general, el paso de la proteína PrP a través de este canal se inicia por el extremo amino terminal y se continúa hasta que se adiciona el anclaje del GPI y el enramado de carbohidratos, modificaciones que permiten su tránsito hacia la membrana plasmática. Sin embargo, algunos cambios en la secuencia de los residuos de aminoácidos disminuyen la velocidad de translocación de la proteína, lo que permite la aparición de un intermediario estructural, denominado Ctm-PrP, el cual tiene su extremo amino terminal en el lumen del RER y su extremo carboxilo terminal en el citosol. Esto puede favorecer la autoasociación del intermediario y la formación de las fibras amiloideas. La mutación Val 117 ala en el gen del prion humano es de este tipo y está estrechamente relacionada con la herencia dominante del síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS).

La expresión de la mutante Val 117Ala (además de otras mutantes) produce la acumulación del Ctm-PrP en el cerebro de los ratones transgénicos (Tg), los cuales sufren una rápida degeneración del sistema nervioso central sin la formación de la isoforma infecciosa del prion, la PrP^{Sc}. Esto sugiere que la Ctm-PrP puede ser una molécula neurotóxica común tanto para las

enfermedades genéticas como las adquiridas (1).

La proteína PrP^C se expresa en el sistema nervioso central, en el tejido linfático y en las uniones neuromusculares en forma de una glicoproteína asociada a la membrana plasmática por medio de un anclaje de GPI (Fig. 1). La estructura covalente de la forma patógena (PrP^{Sc}) es idéntica a la PrP^C, pero tiene una conformación tridimensional radicalmente diferente, lo cual produce su agregación y la formación de partículas estables. Aunque la PrP^{Sc} aún no se ha purificado a homogeneidad, se han obtenido fracciones proteicas con un alto grado infeccioso, las cuales contienen una gran proporción de la PrP^{Sc}. La ausencia de ácidos nucleicos en estas preparaciones, además de la evidencia genética, permite concluir que la encefalopatía esponjiforme transmisible (TSE de sus siglas en inglés) es un conjunto de enfermedades producidas únicamente por proteínas (4).

Debido a que la PrP^{Sc} presenta un núcleo resistente a la acción de la proteinasa K (PK) en el tejido cerebral infectado, la isoforma PrP^C puede ser rápidamente degradada, mientras que la isoforma infecciosa se mantiene presente (5). La microscopía electrónica de la fracción enriquecida con este material resistente a la acción de la PK muestra la presencia de material fibrilar (6).

MODELOS PARA LA PROPAGACIÓN PRIÓNICA

Debido a las características estructurales de las PrP^{Sc} infecciosas, se ha propuesto un modelo para explicar el desarrollo de las enfermedades causadas por estas proteínas (Fig. 2). En este modelo, la PrP^C nativa está en equilibrio con la isoforma conformacional PrP^{Sc} (Fig. 2 A). En este momento, la isoforma PrP^{Sc} puede asociarse a otra molé-

cula de PrP^{Sc}, o bien, promover la conversión de la PrP^C a la conformación PrP^{Sc}. Esta asociación puede continuarse hasta formar un núcleo estable (Fig. 2 B), el cual crece por adición de nuevas moléculas de PrP^{Sc}. Posteriormente, esta estructura se divide en pequeñas unidades infecciosas (Fig. 2 C), las cuales continúan creciendo, propagando así la formación de estructuras fibrilares (Fig. 2 D). Este tipo de polimerización lineal se ha modelado matemáticamente y se han predicho muchas de las observaciones obtenidas durante la evolución de la enfermedad (7).

Este mecanismo también explica el hecho de que la enfermedad priónica puede aparecer por la herencia de mutaciones que desestabilizan la estructura de la forma PrP^C y que predisponen su conversión a la forma PrP^{Sc}, o bien por medio de infecciones iatrogénicas o dietéticas con la isoforma PrP^{Sc}. Asimismo, la evolución de los casos clínicos en donde las causas de la enfermedad no son conocidas (casos esporádicos), también puede ser explicada por el mismo paradigma descrito en el modelo, en donde la aparición de la enfermedad puede deberse a una mutación somática o por la conversión espontánea de la proteína silvestre a la conformación PrP^{Sc}. Algunos estudios recientes sugieren que el síndrome de Creutzfeldt-Jakob del tipo esporádico está asociado a una cirugía en la historia clínica del paciente o a una estancia prolongada en una granja (8). Sin embargo, para confirmar estas observaciones clínicas, aún debe desarrollarse un estudio estadístico riguroso.

CONFORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE LA PrP^C

En la década de los 90's se determinó la conformación de la PrP^C recombinante de ratón (9), de hámster

(10) y de humano (11) por medio de resonancia magnética nuclear (NMR de sus siglas en inglés), la cual en esencia, es la misma: 3 α -hélices y 2 láminas β -plegadas asociadas por dos o tres puentes de hidrógeno. Lo anterior contrasta con conformación de la isoforma PrP^{Sc}, cuya estructura está enriquecida con lámina β -plegadas (40% lámina β -plegadas y 30% α -hélices, determinados por la Transformada de Fourier de la espectroscopía en el infrarrojo, FTIR por sus siglas en inglés) (12). Sin embargo, aunque no se cuenta con la estructura tridimensional del monómero de la PrP^C o la PrP^{Sc} determinada por métodos cristalográficos, en el 2001, el grupo de Yee (13) reportó la estructura cristalográfica con una resolución de 2 Å de un dímero del prion humano. Este dímero es el resultado de la interconversión tridimensional

de la α -hélice 3 ubicada en el extremo carboxilo terminal y el rearrreglo del puente de disulfuro. En la interfase del dímero se forma una lámina β -plegada antiparalela intercategorial trenzada, la cual está constituida por los residuos de aminoácido que forman a la α -hélice 2 en la estructura monomérica determinada por NMR. Las mutaciones que se relacionan con las enfermedades priónicas familiares se localizan en las regiones involucradas en la interconversión de la estructura α -hélice en lámina β -plegada. La estructura determinada a partir del cristal, sugiere que la oligomerización a través de la interconversión tridimensional de este dominio puede ser un paso importante en la vía de transformación de la PrP^C en la PrP^{Sc}.

En cuanto a la cinética del plegamiento, se han realizado estudios de

fluorescencia de flujo detenido (stopped-flow) empleando el núcleo de la PrP^C de ratón resistente a las proteasas, denominado MoPrP⁽¹²¹⁻²³¹⁾, con la mutación Phe175Trp, el cual presenta la misma estructura y estabilidad que la proteína silvestre, pero muestra un mayor cambio en la fluorescencia durante su desnaturalización debido al triptofano incorporado. Aunque a temperatura ambiente el plegamiento es muy rápido para ser observado, a 4°C, éste ocurre con un tiempo de vida medio de 170 μ s sin la presencia de algún intermediario. De acuerdo con estas observaciones, los estudios de intercambio de hidrógeno/deuterio con la PrP^C humana, muestran que la constante de equilibrio que describe la distribución de los estados nativo y desnaturalizado tiene el mismo valor que el factor de protección del intercambio de hidrógeno/deuterio (11); es decir, que la ruta más probable para la conversión de la PrP^C a la PrP^{Sc} es a través de un estado desplegado que retiene una pequeña región estructurada de 10 residuos de aminoácido alrededor del puente de disulfuro, y no a través de un intermediario altamente organizado, como ha sido sugerido para el caso de la formación de la placa amiloide en otros sistemas.

No obstante, aunque a pH fisiológico las proteínas recombinantes de PrP^C se desnaturalizan a través de un mecanismo de dos estados, a pH ácido se observa una vía de plegamiento alternativa. Las proteínas PrP^C recombinantes de humano (huPrP⁽⁹⁰⁻²³¹⁾) y de ratón (MoPrP⁽¹²¹⁻²³¹⁾) presentan un intermediario en su vía de plegamiento a pH de 4 (14). La espectroscopía de dicroísmo circular muestra que este intermediario está bien estructurado, con una topología constituida esencialmente de lámina β -plegada, por lo

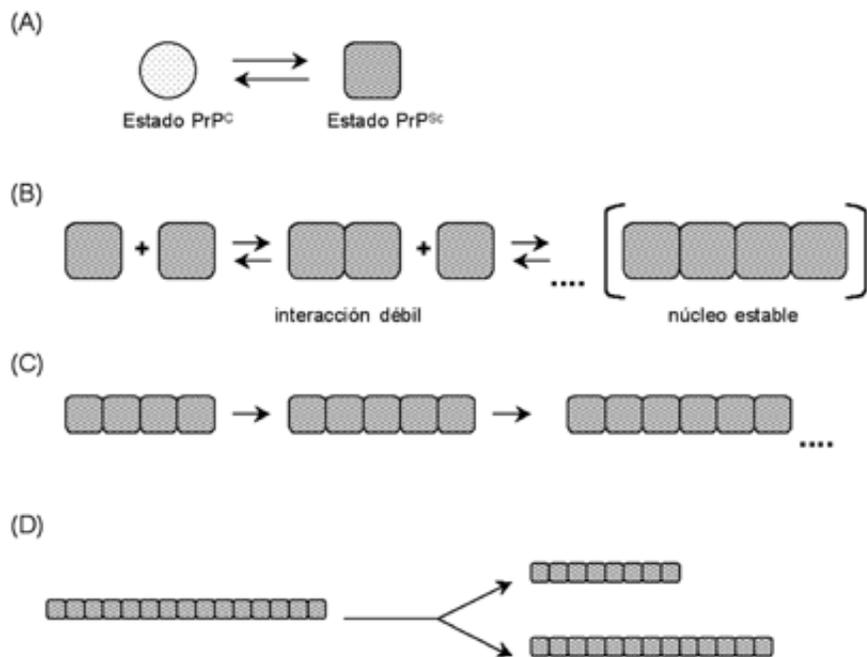


Figura 2. Mecanismo propuesto para la propagación de la estructura PrP^{Sc}. El modelo es dividido en cuatro estados. (A) La estructura PrP^C (círculo) se encuentra en equilibrio con la isoforma PrP^{Sc} (cuadrado). (B) Los monómeros pueden interaccionar entre sí, de forma débil y reversible, hasta constituir un núcleo estable. Una vez que se ha alcanzado este tamaño, los monómeros de PrP^{Sc} pueden asociarse irreversiblemente y permitir así el crecimiento de la estructura fibrilar (C). La partícula infectiva puede dividirse y producir dos unidades menores pero estables, permitiendo multiplicar el número de estructuras fibrilares (D).

que se ha propuesto como un estado intermedio en la vía de formación de la PrP^{Sc}. Aunado a esto, los estudios realizados con un fragmento del prion humano (huPrP⁽⁹¹⁻²³¹⁾), mostraron que a pH ácido y en un ambiente reductor, la PrP se pliega como un monómero soluble constituido casi exclusivamente de láminas β -plegadas (15). Los autores sugieren que las características del medio pueden influir en la transformación de la PrP^C, cuya conformación nativa es de α -hélices, en un monómero altamente compacto y rico en láminas β -plegadas. Este monómero soluble (β -PrP) es resistente a la actividad de la PK, característico de la PrP^{Sc}, y es un precursor de estructuras fibrilares muy similares a las aisladas de cerebros enfermos. No obstante, aún tiene que demostrarse experimentalmente que estas alteraciones en la estructura de los estados conformacionales de la proteína son suficientes para causar la enfermedad.

Las mutaciones del gen PRNP tienen diferentes efectos sobre la proteína sintetizada, por ejemplo, puede predisponer a la molécula a formar agregados, promover la asociación entre la isoformas PrP^{Sc} y la PrP^C, o facilitar la unión de un ligando específico a la proteína silvestre. En este sentido, Glockshuber y cols. (16) realizaron experimentos de mutaciones dirigidas en el gen PRNP humano para relacionar la estabilidad de la PrP^C y su propensión para transformarse en PrP^{Sc}. Sus resultados prueban la hipótesis de que las mutaciones asociadas con las enfermedades priónicas heredadas pueden provocar, en algunos casos, la desestabilización de la PrP^C y promover su transformación a la isoforma PrP^{Sc}. En el dominio del extremo carboxilo (huPrP⁽¹²¹⁻²³¹⁾), el cual es la única región de la proteína con una estructura terciaria bien definida, se loca-

lizan ocho mutaciones asociadas con la presencia de la enfermedad neurológica. Las proteínas mutantes presentan las mismas características espectroscópicas que la proteína silvestre, lo que excluye la posibilidad de que las mutaciones *per se* puedan inducir la conformación PrP^{Sc}. Sin embargo, la estabilidad termodinámica de las proteínas mutantes no se correlaciona con los fenotipos específicos correspondientes. En este sentido, solo cinco de las mutaciones desestabilizan a la proteína, mientras que las restantes presentan la misma estabilidad que la proteína silvestre. Lo anterior sugiere que la desestabilización de la PrP^C no es el único mecanismo para su transformación en la PrP^{Sc}, ni la base para el fenotipo de las enfermedades priónicas heredables.

Por otro lado, Cohen (17) propuso que la conversión conformacional de la isoforma PrP^C en la PrP^{Sc} puede estar bajo un control termodinámico o cinético. El hecho de que la proteína priónica pueda encontrarse en dos estructuras conformacionales, el monómero representado por la PrP^C y la multimérica formada por la PrP^{Sc}, donde la proteína silvestre es más estable en la conformación PrP^C, mientras que la mutante prefiere adoptar la forma PrP^{Sc}, puede deberse a un control termodinámico si la diferencia en la estabilidad de la proteínas silvestre y mutante en los estados C y Sc es grande, o cinético si la barrera cinética que evita la conversión de la secuencia silvestre (WT) del estado C al Sc es eliminada por la mutación que causa la enfermedad (Fig. 3 A y B).

La estabilidad conformacional de una amplia variedad de proteínas mutantes sugiere que una mutación puntual puede modificar el valor del ΔG de plegamiento en aproximadamente 2 ó 3 kcal/mol (18). En este

sentido, si el modelo termodinámico es el adecuado y la conversión de la especie monomérica PrP^C en la multimérica PrP^{Sc} está controlada por la diferencia en las ΔG de cada estado (Fig. 3 A), se podría esperar que la producción de la PrP^{Sc} a partir de la proteína silvestre sea de aproximadamente el 1% de la producción de la PrP^{Sc} a partir de la mutante. Esta predicción no coincide con los datos neuropatológicos y las observaciones epidemiológicas del síndrome de CJ esporádico, probablemente porque no se ha incluido en el análisis la agregación de la PrP^{Sc}, que puede desviar el equilibrio hacia el estado Sc. Aunado a esto, los experimentos de irradiación ionizante sugieren que la partícula infecciosa mínima es un dímero de PrP^{Sc} (19). Si se considera la energía requerida para la formación de un dímero, entonces la formación de la PrP^{Sc} a partir de la proteína silvestre podría ser tan solo del 0.01% de la producción total de la PrP^{Sc} a partir de la mutante. Además, el valor de la cooperatividad en la formación del dímero a partir de la proteína mutante depende del sitio donde se encuentra la sustitución del residuo de aminoácido. Así, la contribución de la cooperatividad a la diferencia de la energía libre entre ambas isoformas ($\Delta(G^{WT/MUT})$) no excede de 2-3 kcal/mol. En esas condiciones extremas, la forma PrP^{Sc} silvestre debería ser tan común como la especie PrP^{Sc} mutante, donde los niveles de la PrP^{Sc} silvestre podrían ser detectados a través de bioensayos de infectividad. Sin embargo, esto no coincide con los estudios de inoculación de la PrP^C (20).

En contraste, el modelo de control cinético de la conversión de la PrP^C en la PrP^{Sc} aporta una explicación sencilla para los resultados clínicos y experimentales (Fig. 3 B). En este modelo, la isoforma PrP^{Sc}

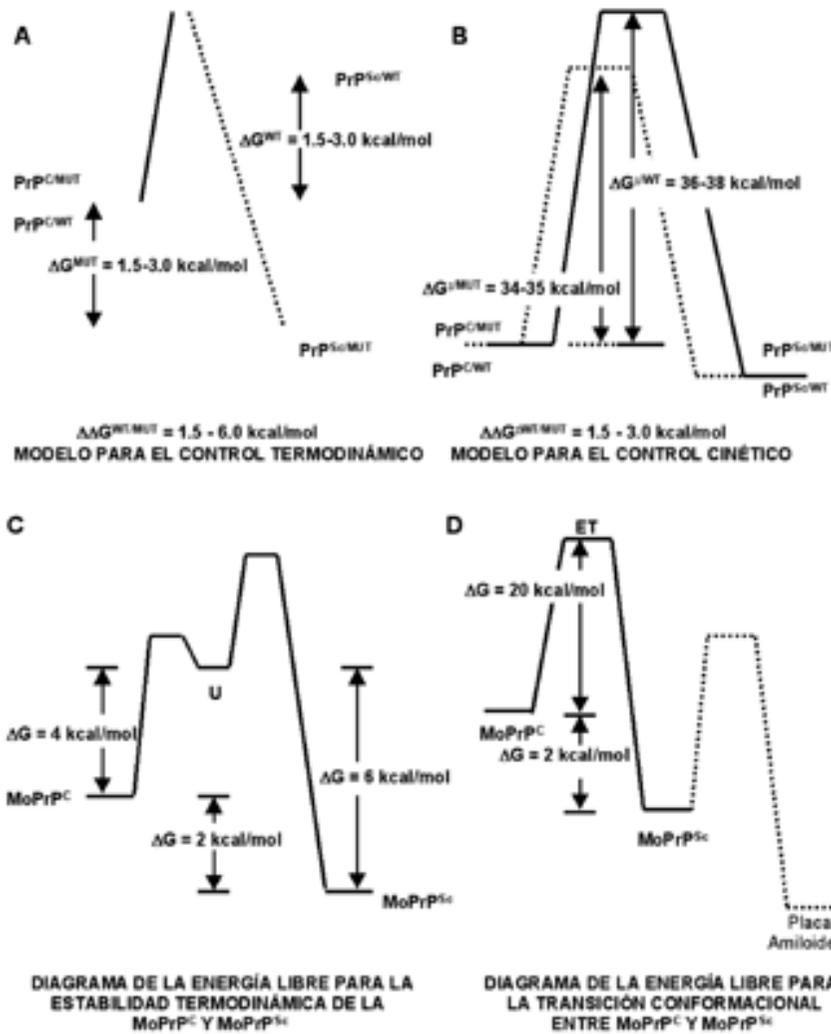


Figura 3. Diagramas de la energía libre para la estabilidad y la transición conformacional de la proteína priónica. Modelos del control termodinámico (A) y cinético (B) para la conversión de la isoforma PrP^C silvestre (WT) y mutante (MUT) en la isoforma PrP^{Sc}. DG es la diferencia en la energía libre entre los estados PrP^C y PrP^{Sc}, y DG^{\ddagger} es la energía de activación entre esos dos estados. $D(G^{WT/MUT})$ es la diferencia entre el DG^{WT} y el DG^{MUT} . Los diagramas de la energía libre para las proteínas silvestre (WT) se muestran en líneas continuas y para la proteína mutante en líneas punteadas. La estabilidad termodinámica de las proteínas MoPrP^C y MoPrP^{Sc} determinadas a pH de 3.6 es de 4 kcal/mol y 6 kcal/mol, respectivamente, mientras que el DG entre ambas proteínas es de 2 kcal/mol. El estado desnaturado se representa por una U (C). El diagrama de la energía libre para la transición conformacional, representa la energía de activación determinada a pH de 3.6, donde ET es el estado de transición (D). La isoforma PrP^{Sc} presenta una transición adicional hacia la formación de la placa amiloide (línea punteada).

sólo necesita ser marginalmente más estable que la PrP^C (ΔG entre -1.5 y -3 kcal/mol). Para explicar la ausencia de la PrP^{Sc}, la barrera energética que separa a ambos estados debería tener un valor de ΔG^{\ddagger} de entre 36 y 38 kcal/mol, si se supone la presencia de un estado de transición (Fig. 3 B). En este senti-

do, un pequeño cambio en la magnitud de la barrera de activación ($\Delta(G^{\ddagger}_{WT/MUT}) = 1.5$ a 3 kcal/mol) podría producir una disminución en la velocidad de conversión en aproximadamente 100 veces. Los resultados obtenidos muestran que el cambio en la estabilidad de algunas mutantes es despreciable ($\Delta G = -2$

y 0.4 kcal/mol), mientras que para seis de ellas es mayor a 1.5 kcal/mol. Probablemente, las primeras tienen un mayor impacto en el ΔG^{\ddagger} que en la estabilidad de la forma PrP^C. La isoforma PrP^{Sc} también puede tener una influencia en el aspecto cinético del proceso de conversión si actúa como un molde que disminuye la barrera de activación (ΔG^{\ddagger}) para los cambios conformacionales, de una manera similar a como actúa el sitio activo de las enzimas, orquestando la colocación del sustrato para acelerar la velocidad de una reacción.

En general, la formación de los depósitos fibrilares en la enfermedad priónica puede seguir el siguiente esquema:



donde A es la isoforma PrP^C cuyo estado estructural es el de un monómero, A* es un estado conformacional activado de A, el cual es susceptible a experimentar un dramático cambio estructural, B es el estado conformacional alterado que es propenso a la auto-asociación, y B_n es el estado multimérico que representa al material patogénico difícil de reciclar.

En el modelo cinético se pueden establecer dos tipos de barreras para la formación de B_n. Si se trata de una proteína grande y las conformaciones de A y B son muy diferentes, entonces puede existir una gran barrera cinética de tipo entálpico, donde B podría desempeñar el papel de molde para disminuir la barrera energética de los cambios conformacionales. En este sentido, se tienen algunas evidencias que sugieren que las enfermedades priónicas se ajustan a este modelo. Por otra parte, si es una proteína pequeña la que experimenta un gran cambio conformacional, como el péptido

β APP en la enfermedad de Alzheimer o la calcitonina en el carcinoma medular de la tiroides (21), o si se tiene un pequeño cambio conformacional, como en la formación de la hemoglobina fibrilar (22), entonces el paso limitante es la formación del núcleo multimérico estable (B_n). Los resultados de la fibrinogénesis experimental empleando péptidos del tipo β APP, sugieren que esta enfermedad se ajusta al modelo de la polimerización nuclear (23).

En general, para las enfermedades priónicas, dos estados especificados en la ecuación 1 han sido claramente identificados, mientras que para los restantes se tienen algunos candidatos. Las isoformas PrP^C y PrP^{Sc} corresponden a los estados A y B_n respectivamente, donde A es un monómero rico en estructuras α -hélices, mientras que B_n es la forma multimérica rica en estructuras láminas β -plegadas. Aunque el tamaño de la forma multimérica aún no ha sido determinado, los experimentos de irradiación ionizante indican que el tamaño de las partículas infecciosas es de 55 kDa, lo que corresponde a un dímero de la PrP^{Sc} (19). En 1997, Kaneko y cols. (20) sugirieron que los residuos de aminoácidos en las posiciones 168, 172, 215 y 219 son importantes en la auto-interacción de la PrP^{Sc}. Experimentos de NMR muestran que en la estructura tridimensional de varias recombinantes de la PrP^C, los residuos 172, 215 y 219 forman un "parche" continuo en la superficie de la molécula. Los experimentos de mutagénesis dirigida mostraron que los residuos 172 y 171, aunque forman parte de este parche, no son indispensables para la interacción. Por otra parte, se ha sugerido que la reorganización estructural que da lugar a la formación de A* involucra el alargamiento de una α -hélice hacia el extremo amino terminal,

hasta incluir en ésta al residuo 168, con lo que se forma una superficie continua (10). En este sentido, Jackson (15), empleando un prion humano recombinante, huPrP⁽⁹⁰⁻²³¹⁾, identificó una forma monomérica rica en estructuras β , capaz de formar moléculas fibrilares; aunque aún no se cuenta con evidencias experimentales que demuestren que se trata de una molécula infecciosa, es un buen candidato para representar al estado B. Sin embargo, aún es necesario hacer una mejor caracterización de cada uno de esos estados para refinar el modelo de la multiplicación de las partículas infecciosas en las enfermedades priónicas.

Recientemente, Cohen y cols. (24), han demostrado que en el plegamiento hacia el estado nativo de la proteína recombinante del prion del ratón (MoPrP⁽⁸⁹⁻²³¹⁾), existe un control cinético. Por medio de la espectroscopía de dicroísmo circular y de la cromatografía de exclusión molecular, se determinó que la desnaturalización por urea de la isoforma PrP^C tiene un ΔG de -3.6 kcal/mol, mientras que para la isoforma PrP^{Sc} el ΔG es de -6.1 kcal/mol (Fig. 3 C). Lo anterior indica que la isoforma PrP^{Sc}, rica en estructuras láminas β -plegadas, es termodinámicamente más estable que la isoforma PrP^C, rica en estructuras α -hélices. La transición conformacional entre ambas isoformas tiene una barrera energética de 20 kcal/mol, la cual es asociada con el proceso de desnaturalización y con la formación de oligómeros de la isoforma PrP^{Sc} (Fig. 3 D). En un ambiente ácido y en presencia de urea, la proteína MoPrP⁽⁸⁹⁻²³¹⁾ se encuentra parcialmente desnaturalizada, en estas condiciones se evita la trampa cinética que dirige la consolidación de la isoforma PrP^C y la proteína se pliega directamente en la isoforma PrP^{Sc}, la cual es termodinámicamente

más estable (Fig. 3 D). En estas condiciones, la formación de la placa amiloidea se ve favorecida.

Asimismo, este grupo modeló el plegamiento de los priones empleando un modelo de malla ("lattice model") de baja resolución para el plegamiento de las proteínas (25). Si en el modelo se permite la dimerización de las proteínas durante su re-plegamiento, sólo una pequeña proporción de éstas (alrededor del 17%) adopta un estado nativo homodimérico. El arreglo de la estructura de este nuevo estado nativo homodimérico es muy diferente en conformación a la estructura del monómero nativo. Asimismo, mostraron que las proteínas modelo que son relativamente menos estables como monómeros, tienden a auto-asociarse en un homodímero nativo estable. Sus resultados sugieren que las proteínas cuyo estado nativo es un monómero inestable, adquieren una mayor estabilidad por medio de incrementar el número de las interacciones entre los monómeros, dando por resultado un estado nativo multimérico cuya conformación puede ser sustancialmente diferente al monómero nativo inicial. Este modelo que explica el plegamiento aberrante de las proteínas, puede tener una gran repercusión en las enfermedades asociadas con la agregación de las proteínas.

El grupo de Chang (26) ha estudiado la participación del puente de disulfuro (Cys179-Cys214) en el plegamiento de la proteína recombinante del prion de ratón (MoPrP⁽²³⁻²³¹⁾). En condiciones reductoras, la proteína muestra unas propiedades de plegamiento muy inusuales; por ejemplo, en ausencia de cualquier agente desnaturalizante, su plegamiento es extremadamente lento, sin importar el valor del pH del medio. Sin embargo, a pH de 8 y en presencia de algún

agente desnaturizante (4 M de urea o 2 M de hidrocloreto de guanidina), la proteína MoPrP⁽²³⁻²³¹⁾ con las cisteínas reducidas, es capaz de plegarse hacia la estructura nativa. Más aún, este plegamiento puede ser estimulado por la presencia de moléculas oxidantes tales como el glutatión oxidado. Por otra parte, el plegamiento de la MoPrP⁽²³⁻²³¹⁾ reducida en condiciones ácidas (pH = 4) y en presencia de 4 M de urea, produce tres isómeros conformacionales distintos al estado nativo. De estos estudios, los investigadores sugieren que la MoPrP⁽²³⁻²³¹⁾ reducida puede adoptar una estructura muy rígida, donde las cisteínas se encuentran ocultas en el núcleo hidrofóbico; la presencia de agentes desnaturizantes o un pH ácido desestabiliza esta estructura rígida y disminuye la barrera energética, lo que permite la oxidación de las cisteínas y el plegamiento de la proteína. Con respecto a la producción de tres distintos isómeros conformacionales, éstos presentan dos cisteínas libres y son ricos en estructuras láminas β -plegadas (determinadas por dicroísmo circular). El hecho de que puedan ser separados por técnicas de HPLC, indica que el prion es capaz de adoptar distintas estructuras conformacionales estables que son separadas por barreras energéticas.

Por otra parte, el grupo de Inouye y Kirschner (27) estudió el núcleo hidrofóbico de los priones, en particular, explorando el efecto de la hidratación alrededor del sitio de la mutación en los cambios estructurales que experimenta la proteína PrP. Para esto, se emplearon péptidos sintéticos derivados de la PrP, donde se incluye la mutación Pro102Leu en el dominio hidrofóbico, característica del síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS). Asimismo, analizaron el efecto de la

hidratación de las mutaciones Ala \rightarrow Val sobre el plegamiento del péptido. Los péptidos sintéticos que utilizaron fueron: dos secuencias que incluyen al núcleo hidrofóbico del prion de hámster sirio, la primera abarca desde el residuo 106 al 122 (SHa⁽¹⁰⁶⁻¹²²⁾), la otra desde el residuo 104 al 122 con las mutaciones Ala113Val, Ala115Val y Ala118Val (SHa⁽¹⁰⁴⁻¹²²⁾, 3Ala \rightarrow Val); el tercer fragmento fue el segmento hidrofóbico del prion de ratón, que se limita en los residuos 89 y 143 (Mo⁽⁸⁹⁻¹⁴³⁾); el cuarto fragmento es el segmento hidrofóbico del prion de ratón sustituido en la prolina 101 por una leucina (Mo⁽⁸⁹⁻¹⁴³⁾, Pro101Leu).

La difracción de rayos X del péptido SHa⁽¹⁰⁶⁻¹²²⁾ muestra la formación de una estructura parecida a una loza de 33 Å de grueso, la cual está estabilizada por una gran cantidad de puentes de hidrógeno. En contraste, cuando este péptido liofilizado se equilibró contra una humedad relativa del 100%, mostró muy pocas estructuras del tipo lámina β -plegada. En condiciones similares, los péptidos mutados SHa⁽¹⁰⁴⁻¹²²⁾ 3Ala \rightarrow Val, y el MoPrP⁽⁸⁹⁻¹⁴³⁾ Pro101Leu, formaron estructuras fibrilares β -cruzadas de 40 Å de ancho, lo que apoya la hipótesis de que la secuencia hidrofóbica forma un molde o núcleo que promueve el β -plegamiento. Asimismo, estas mutaciones favorecen el plegamiento de estos péptidos en estructuras compactas, lo que repercute en la formación de estructuras β -fibrilares de gran tamaño.

Sin embargo, aunque dichos estudios han aportado una gran cantidad de evidencias experimentales sobre la transformación de la proteína priónica PrP^C en la isoforma PrP^{Sc}, éstos se han realizado en soluciones acuosas, lo que contrasta con la situación biológica, donde la proteína priónica PrP^C se encuentra

asociada a la membrana celular.

En este sentido, el grupo de Surewicz (28) estudió las alteraciones en la conformación del prion humano originadas por su interacción con las membranas lipídicas. Se utilizaron tres péptidos derivados del prion humano: huPrP⁽²³⁻²³¹⁾, que incluye a toda la proteína, excepto la región del anclaje del GPI; huPrP⁽²³⁻¹⁴⁵⁾, que incluye sólo al extremo N-terminal y huPrP⁽⁹⁰⁻²³¹⁾, que incluye sólo al extremo C-terminal (Fig. 1 A). La proteína huPrP⁽²³⁻²³¹⁾ se asocia a las membranas de vesículas constituidas por fosfatidilserina y fosfatidilcolina. Esta interacción, que depende del pH, es particularmente grande en condiciones ácidas. Los datos espectroscópicos muestran que la asociación de la huPrP⁽²³⁻²³¹⁾ a las membranas produce que la región del N-terminal se ordene formando estructuras α -hélices. Por otra parte, el dominio plegado del extremo C-terminal empieza a desestabilizarse, especialmente a pH bajos, mientras que su asociación a la membrana es pobre. Debido a que los fragmentos de la PrP^C empleados en este estudio se sobrelapan en la región 90-145, es difícil localizar con precisión los sitios de unión de la proteína con la membrana. Sin embargo, el análisis de la desnaturización térmica de la proteína huPrP⁽²³⁻²³¹⁾ en presencia de las vesículas no es reversible, lo que sugiere la formación de agregados de tipo proteico. Estos datos correlacionan con los resultados reportados por Riek (9), los cuales indican que una de las superficies del dominio plegado presenta carga positiva y es relativamente hidrofóbica (alto momento hidrofóbico), lo que le permite interactuar con la superficie de la membrana. En contraste con la proteína huPrP⁽²³⁻²³¹⁾ y el fragmento 23-145, el fragmento que incluye la región del carboxilo

terminal solo se une a la membrana a pH inferior a 6. Esto se correlaciona con la distribución de los residuos de aminoácidos cargados positiva o negativamente dentro de los diferentes segmentos de la PrP^C: la proteína completa, así como la huPrP⁽²³⁻¹⁴⁵⁾ son muy básicas y sus puntos isoeléctricos son 9.3 y 10.6, respectivamente, mientras que el punto isoeléctrico del segmento huPrP⁽⁹⁰⁻²³¹⁾ es de 7.2. El comportamiento de unión de los diferentes fragmentos a la membrana y el requerimiento de fosfolípidos ácidos, sugieren que la interacción de la proteína o sus fragmentos con los lípidos de la membrana se establece por fuerzas electrostáticas. No obstante, aún no se puede descartar la participación del efecto hidrofóbico. En este sentido, Swietnicki y cols. (29) demostraron que a pH ácido se induce un incremento en el área hidrofóbica expuesta por el fragmento huPrP⁽⁹⁰⁻²³¹⁾.

En conjunto, estos resultados muestran que existen diferencias sustanciales en la estabilidad y la conformación de las proteínas PrP

recombinantes humanas asociadas a las membranas lipídicas, y son diferentes a lo observado cuando la proteína está libre en la solución. Lo anterior sugiere que las interacciones entre la membrana y la proteína PrP pueden desempeñar un papel importante en modular la transición conformacional de la proteína, en especial la conversión entre la PrP^C a la isoforma PrP^{Sc}.

CONCLUSIONES

Hasta ahora se ha reforzado experimentalmente la participación de las proteínas priónicas como el agente involucrado en la aparición y el desarrollo de diferentes enfermedades neurodegenerativas. El avance en el conocimiento de la naturaleza de las enfermedades priónicas incluyen la determinación de la estructura tridimensional de la PrP^C y su dinámica de plegamiento, así como la caracterización de diferentes estados durante el plegamiento que pueden estar involucrados en la conversión a la isoforma PrP^{Sc}. La susceptibilidad proteolítica, así como el análisis de tejidos

cerebrales enfermos, mostraron que la PrP^{Sc} puede adoptar diferentes estados conformacionales. Aunado a esto, algunas evidencias sugieren que la interacción de la proteína PrP^C con la membrana celular puede desencadenar su transformación en la isoforma PrP^{Sc}. Sin embargo, aún es necesario diseñar experimentos para identificar las diferentes estirpes priónicas y la enfermedad neurodegenerativa a la que dan origen, con lo que se pueden desarrollar terapias génicas encaminadas a preservar la salud de los individuos. Mientras tanto, es muy importante desarrollar pruebas de laboratorio para detectar la forma patógena del prion en los animales vivos y evitar que dichas enfermedades se dispersen.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Alejandro Fernández la revisión crítica del manuscrito. Este trabajo fue parcialmente apoyado por la DGA-PA de la UNAM (proyecto IN238402-3 para OFH e IN200399 para FM).

REFERENCIAS

1. Hope J. (2000) Prions and neurodegenerative diseases. *Curr Opin Gen Dev* 10: 568-574.
2. Brown P, Will RG, Bradley R, Asher DM, Detwiler L. (2001) Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jacob disease: background, evolution and current concerns. *Emerg Infect Dis* 7: 6-16.
3. Hegde RS, Voigt S y Lingappa VR. (1998) Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 2:85-91.
4. Graham SJ y Clarke AR (2000) Mammalian prion proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10:69-74.
5. Micklethwait MP, Bolton DC y Prusiner SB. (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35:57-62.
6. Prusiner SB, Micklethwait MP, Bowman K, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF y Glenner GG. (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35:349-358.
7. Masel J, Jansen VAA y Nowak MA. (1999) Quantifying the kinetic parameters of prion replication. *Biophys Chem* 77:139-152.
8. Collins S, Law MG, Fletcher A, Boyd A, Kaldor J y Masters CL. (1999) Surgical treatment and risk of sporadic Creutzfeldt-Jacob disease: a case-control study. *Lancet* 353:693-697.
9. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R y Wüthrich K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382:180-182.

10. James TL, Liu H, Ulyanov NB, Farr-Jones S, Zhang H, Donne DG, Kaneko K, Groth D, Mehlhorn I, Prusiner SB, et al. (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10086-10091.
11. Hosszu LLP, Baxter NJ, Jackson GS, Power A, Clarke AR, Waltho JP, Craven CJ y Collinge J. (1999) Structural mobility of the human prion protein probed by backbone hydrogen exchange. *Nat Struct Biol* 6:740-743.
12. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mahlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE y Prusiner SB. (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10962-10966.
13. Knaus KJ, Morillas M, Swietnicki W, Malone M, Surewicz WK, Yee VC (2001) Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol* 8(9):770-774.
14. Hornemann S y Glockshuber R. (1998) A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121-231) induced by acidic pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6010-6014.
15. Jackson GS, Hosszu LLP, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H, Craven CJ, Waltho JP, Clarke AR y Collinge J. (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrilogenic conformations. *Science* 283:1935-1937.
16. Liemann S y Glockshuber R. (1999) Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion protein diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochemistry* 38:3258-3267.
17. Cohen FE. (1999) Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol* 293:313-320.
18. Mathews BW. (1996) Structural and genetics analysis of the folding and function of T4 lysozyme. *FASEB J* 10:35-41.
19. Bellinger-Kawahara CG, Kemper E, Groth DF, Gabizon R y Prusiner SB. (1988) Scrapie prion liposomes and rods exhibit target sizes of 55 000 Da. *Virology* 164:537-541.
20. Kaneko K, Willie H, Mehlhorn I, Zhang H, Ball H, Cohen FE, Baldwin MA y Prusiner SB. (1997) Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides. *J Mol Biol* 270:574-586.
21. Schifter S. (1997) Expression of the calcitonin gene family in medullary thyroid carcinoma. *Peptides* 18:307-317.
22. Mirchev R y Ferrone FA. (1997) The structural link between polymerisation and sickle cell disease. *J Mol Biol* 265:475-479.
23. Jarrett JT y Lansbury PT Jr. (1993) Seeding "one dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73:1055-1058.
24. Baskakov IV, Legname G, Prusiner SB y Cohen FE. (2001) Folding of prion protein to its native α -helical conformation is under kinetic control. *J Biol Chem* 276:19687-19690.
25. Harrison PM, Chan HS, Prusiner SB y Cohen FE. (1999) Thermodynamics of model prions and its implications for the problem of prion protein folding. *J. Mol. Biol.* 286, 593-606
26. Lu B-Y, Beck PJ y Chang J-Y. (2001) Oxidative folding of murine prion mPrP(23-231). *Eur J Biochem* 268:3767-3773.
27. Inouye H, Bond J, Baldwin MA, Ball HL, Prusiner SB y Kirschner DA. (2000) Structural changes in a hydrophobic domain of the prion protein induced by hydration and by Ala \rightarrow Val and Pro \rightarrow Leu substitutions. *J Mol Biol* 300:1283-1296.
28. Morillas M, Swietnicki W, Gambetti P y Surewicz WK. (1999) Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem* 274:36859-36865.
29. Swietnicki W, Petersen RB, Gambetti P y Surewicz WK (1997) pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP(90-231). *J Biol Chem* 272:27517-27520.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Rafael Moreno Sánchez y Emma Saavedra.
Correo E: rmorenos@campus.iztacala.unam.mx

Cinética Enzimática. Inhibición por sustrato

Para determinar la afinidad de la Piruvato Cinasa (PK) de un extracto del parásito *Entamoeba histolytica* hacia el fosfoenolpiruvato (PEP), se varió la concentración del sustrato en un intervalo de valores común-

mente empleado para las mismas enzimas de otros organismos. La actividad de la PK se determinó espectrofotométricamente a 340 nm acoplando la formación de piruvato con la oxidación del NADH la cual es catalizada por la Lactato Deshidrogenasa. Los datos fueron los siguientes:

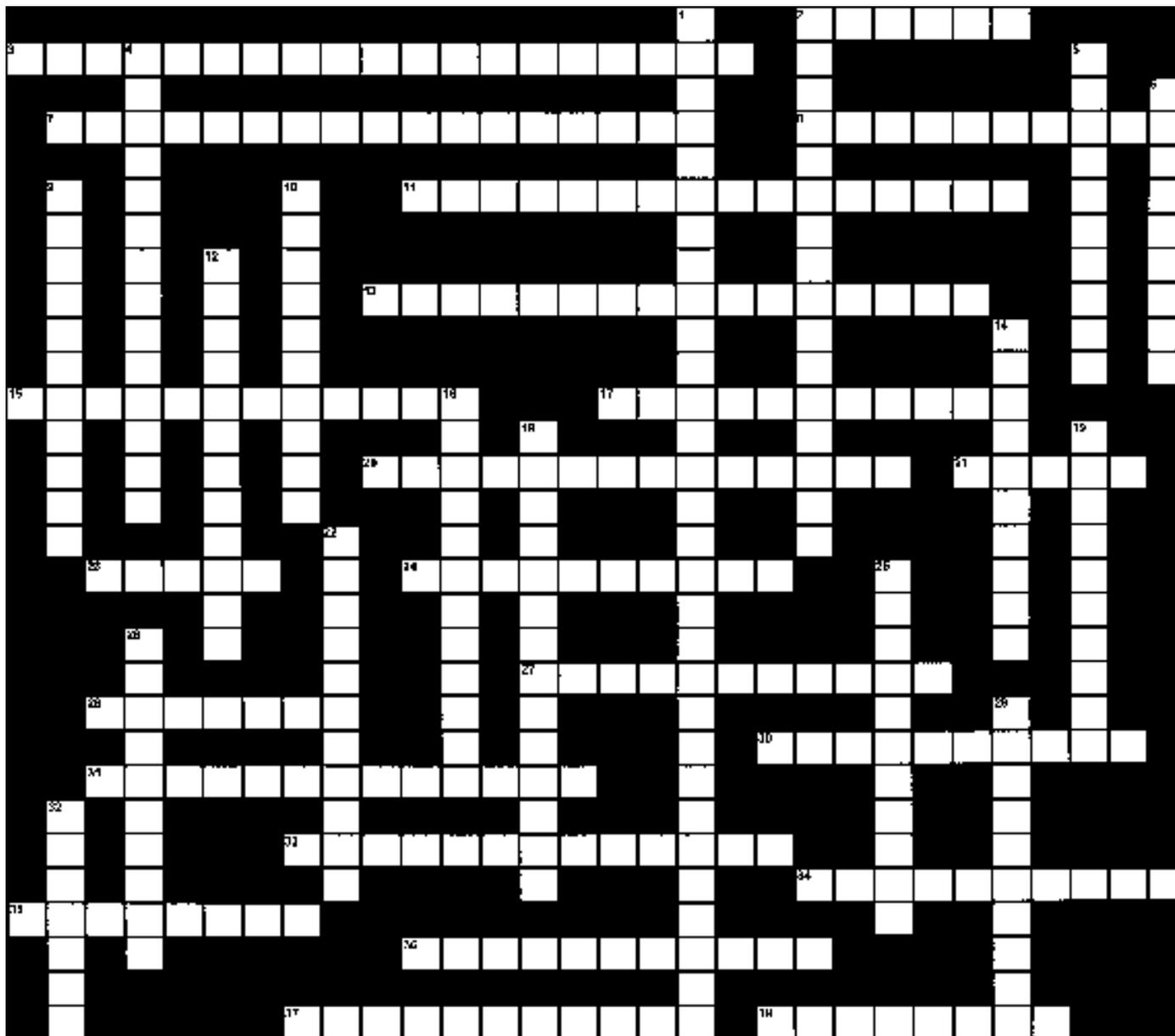
[PEP], μM	Velocidad inicial, $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg proteína})^{-1}$
5	4.0
10	7.0
20	22.0
50	41.0
200	45.0
300	33.0
500	32.0
1000	25.0
1500	16.0
2000	12.5

Se puede apreciar que hay un efecto inhibitorio de las altas concentraciones de PEP, lo cual sugiere la existencia de un segundo sitio de unión en la enzima. Determinar la constante de disociación (K_{si}) del segundo sitio de unión para sustrato.

CRUCIBIOQ

METABOLISMO DEL COLESTEROL

Yolanda Saldaña Balmori



HORIZONTALES

- 2 Ácido abundante en la bilis humana, se forma por la pérdida de 3 carbonos del 7α -hidroxicolesterol.
- 3 La del tipo II tiene como característica una disminución en la velocidad de depuración de LDL y colesterol, que conduce a aterosclerosis y coronariopatía.
- 7 Región celular donde se sintetiza el colesterol.
- 8 Término que conjunta a las hormonas femeninas: estradiol, estrona y estriol las cuales aumentan gradualmente

su concentración durante el embarazo.

- 11 Llamadas así a las proteínas de las lipoproteínas.
- 13 Esteroides de 21 carbonos, en humano son promotores de la gluconeogénesis, lipólisis en las extremidades y lipogénesis en cara y tronco.
- 15 Andrógeno testicular sintetizado a partir de androstendiona.
- 17 Molécula que pirofosforilada resulta de la descarboxilación del mevalonato.
- 20 Acumulación de colesterol tanto libre como esterificado y de lipoproteínas en el endotelio de la pared arterial.
- 21 Función que mantiene unido el colesterol a un ácido graso.

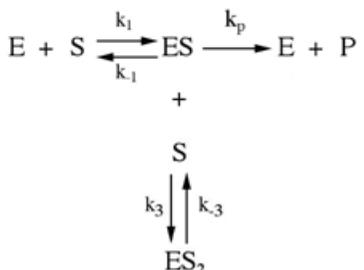
- 23** Tiene función emulsificante ya que disminuye la tensión superficial; es importante en la digestión y absorción de los lípidos.
- 24** Hormona que promueve la translocación del calcio a través de la membrana celular intestinal; este ión, junto con el fósforo intervienen en la formación de hueso.
- 27** Se encuentra en las heces debido a la reducción que sobre el colesterol realizan las bacterias intestinales.
- 28** Enzima que permite la formación de acetoacetil coenzima A a partir de dos moléculas de acetil coenzima A.
- 30** Se forma con ayuda de la óxido escualeno ciclasa.
- 31** Se encuentran en el quilo y transportan a todos los lípidos dietéticos en la circulación.
- 33** En este grupo de moléculas quedan incluidos los quilomicrones, las VLDL, IDL, LDL, HDL₂ y HDL₃.
- 34** Término que conjunta tanto a las formas naturales como a las sintéticas de la vitamina A.
- 35** Se encuentra pirofosforilado, dos unidades de esta estructura con ayuda de la escualeno sintetasa dan lugar a una molécula de 30 átomos de carbono.
- 36** Corteza en donde se sintetizan glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos.
- 37** Producto de la reacción de un ácido biliar y un compuesto que contiene azufre.
- 38** Es sintetizado en la corteza suprarrenal y es el glucocorticoide predominante en el humano.
- 4** Circulación que permite que una parte de las sales biliares regresen al hígado a través de la circulación portal.
- 5** Cuando esta estructura está totalmente reducida y unida al ciclohexano, forma parte del esqueleto de todos los esteroides.
- 6** Producto de la condensación de seis unidades isoprenoides.
- 9** Hormona mineralocorticoide que promueve en riñón, la retención de sodio y la excreción de potasio.
- 10** Clase de hormonas que tienen como efecto la espermatogénesis, características masculinas secundarias y la virilización.
- 12** Globulina plasmática humana que transporta al cortisol y a la corticosterona.
- 14.-** Precursor de ácidos biliares, de hormonas suprarrenales y sexuales, de glucósidos cardíacos y de vitamina D; sus valores normales en sangre son de 150-220 mg/dL.
- 16** Es el primer cuerpo cetónico sintetizado.
- 18** Se produce en la piel mediante la irradiación ultravioleta del 7-deshidrocolesterol.
- 19** Si se activa con 3 ATP y se descarboxila da lugar al isopen-tenil pirofosfato.
- 22** Padecimiento que afecta a algunos varones mayores de 60 años; la testosterona en combinación con otras moléculas, propicia la división incontrolada de las células, ocasionando una hipertrofia prostática benigna.
- 25** Residuo con el cual se encuentran activadas la mayoría de las moléculas precursoras del colesterol.
- 26** Componente de la cadena respiratoria formado a partir de unidades isoprenoides.
- 29** Ácido precursor del colesterol, tiene seis carbonos y proviene de acetil coenzima A.
- 32** Metabolito intermedio de la vía de síntesis del colesterol, tiene 10 carbonos y participa activado con pirofosfato.

VERTICALES

- 1** Estructura base de los esteroides, tiene 17 carbonos distribuidos en cuatro anillos.
- 2** Vía cuyo producto se ha relacionado con el desarrollo de la aterosclerosis cuando su concentración se incrementa en sangre.

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Por lo general, las moléculas de sustrato (S) se unen a los sitios activos de las enzimas (E) para su transformación en producto. Sin embargo, a altas concentraciones de sustrato puede ocurrir la formación de complejos ES improductivos, en los cuales una segunda molécula de sustrato ocupa también el sitio activo, interfiriendo con la catálisis. El esquema cinético de esa interacción se describe a continuación:



Suponiendo equilibrio rápido o estado estacionario, la ecuación de velocidad que representa al mecanismo cinético esquematizado arriba es:

$$v = \frac{V_m}{1 + K_m/S + S/K_{si}} \quad \text{①}$$

en donde

$$V_m = k_p \times E_{\text{total}}; \quad K_m = (k_{-1} + k_p)/k_1; \quad K_{si} = k_{-3}/k_3$$

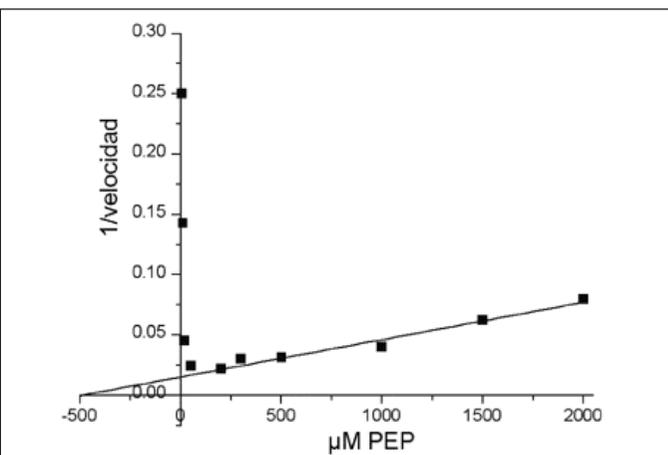
La aplicación de dobles recíprocos a la ecuación resulta en:

$$1/v = 1/V_m + K_m/(V_m \times S) + (S \times K_{si})/V_m \quad \text{②}$$

A altas concentraciones de S, el término K_m/S es muy bajo y puede despreciarse, por lo cual la ecuación 2 se puede reducir a:

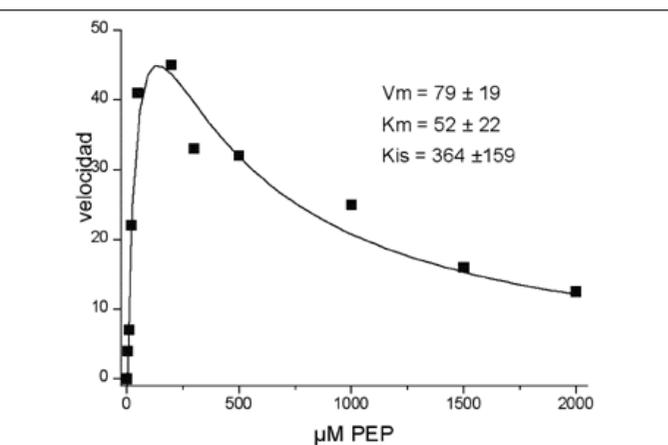
$$1/v = \frac{K_{si}}{V_m} S + \frac{1}{V_m} \quad \text{③}$$

La porción lineal de la gráfica de S versus $1/v$ representa la región en la cual el término K_m/S es muy bajo.



De acuerdo con la ecuación 3 el valor de la ordenada al origen es igual a $1/V_m$, mientras que la abscisa al origen es $-K_{si}$. Por lo tanto, la línea recta indica que la $V_m = 71.4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg proteína})^{-1}$ y la $K_{si} = 464 \text{ μM}$. Para estimar la K_m se sigue el procedimiento usual de graficar los dobles recíprocos, $1/PEP$ versus $1/v$, en la región en la cual la inhibición por sustrato sea muy baja.

Un procedimiento más adecuado para la determinación de los parámetros cinéticos es el de analizar por regresión no lineal el total de los datos experimentales. Para ello se requiere el acceso a programas computacionales que permitan editar la ecuación respectiva y tengan la versatilidad de graficar los resultados. Uno de estos programas es Origen Microcal. Usando este programa, se analizaron los datos de la PK por regresión no lineal con la ecuación 1. Los resultados se muestran a continuación:



La dispersión del ajuste se puede reducir incrementando el número de puntos experimentales en los dos extremos de la gráfica: a bajas concentraciones de PEP (< 100 μM) para la K_m y a muy altas concentraciones de PEP (> 2000 μM) para la K_{si} .

Otras situaciones, analizadas por Dixon y Webb (1979), en las cuales se puede presentar una inhibición por sustrato son:

1. Disminución de la concentración de agua por la presencia de las altas concentraciones de sustrato (p. ej. sacarosa).
2. En una enzima birreactante, uno de los sustratos es un inhibidor competitivo del otro sustrato. Cuando, por ejemplo, se usa azul de metileno como aceptor de electrones, algunos donadores tales como la hipoxantina (xantina oxidasa) y la leucina (L-monooxígeno oxidasa) inhiben competitivamente la unión del aceptor artificial a la enzima.

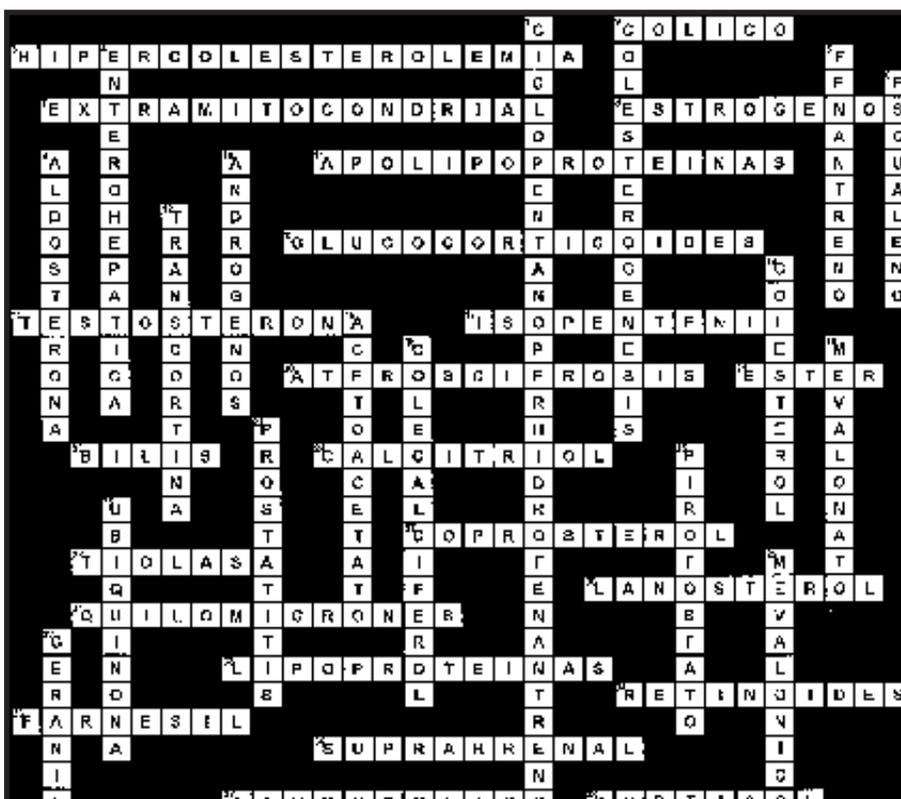
3. Disminución en la concentración del cofactor o activador (Mg^{2+} , Ca^{2+}) por exceso de sustrato (p. ej. PPI o ATP).

Debe notarse que ninguna de estas 3 situaciones sucede en condiciones fisiológicas, sino más bien en el tubo de ensaye, por lo cual siempre es conveniente explorar si la concentración de sustrato recomendada en la literatura para determinar la V_m de la enzima de interés, no ejerce inhibición por sustrato.

BIBLIOGRAFÍA

Dixon M, Webb EC. 1979. Enzymes. Academic Press, New York. Capítulo IV, pp. 126-133.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ METABOLISMO DEL COLESTEROL



DIEZ AÑOS DE LA MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Enhorabuena, Despedida y Bienvenida... el Futuro.

El 13 de Diciembre de 2002, la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) celebró la primera década del Programa de Maestría en Biología Experimental, cuya sede es el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB). A la ceremonia asistieron las máximas autoridades universitarias, encabezadas por el Rector, el Lic. Marco Antonio Aguilar Cortés. En el evento, los oradores: la Coordinadora de Investigación Científica de la UMSNH, la Dra. Eva Soriano y el investigador del IIQB, el Dr. Mauro Martínez Pacheco, rememoraron los eventos que dieron origen al Programa de Maestría. El programa fue fundado por cinco investigadores de tiempo completo, que fueron, además de la Dra. Soriano, el Dr. Carlos Cervantes, el Dr. Rodolfo Farías, el Dr. Alfredo Saavedra-Molina y el M. en C. Hector Urquiza.

Como es obvio, un programa de maestría en ciencias experimentales requiere de un gran número de cursos impartidos por especialistas, por lo que los cinco investigadores, aun con su gran entusiasmo y sus excelentes credenciales, no eran suficientes. Otro problema fue que para aceptar al programa dentro del padrón de excelencia, el CONACyT requería de una planta docente más amplia. En este punto fue donde los pioneros del programa decidieron reclutar a investigadores de diversas instituciones de enseñanza del País como profesores invitados. Se reclutaron varios científicos que trabajasen en áreas afines. Hubo gente de la UNAM, del Instituto Politécnico Nacional (IPN) y del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"(INC).

El perfil del profesor invitado era claro: un investigador con doctorado, adscrito a una institución educativa, con trabajo de investigación trascendente demostrado y con disposición para viajar al menos una vez al semestre a Morelia. Este invitado debería impartir un curso o un tema intensivamente en tres o cuatro días. Los profesores invitados no fueron remunerados económicamente por vía de una nómina pues esto acarrearía muchos inconvenientes administrativos, pero la UMSNH tomó la responsabilidad del pago de los servicios de transporte, hospedaje y alimentación.

Estar dispuesto a viajar a Morelia no era trivial, porque se requería un cierto grado de resistencia y constancia para hacerlo cada semestre o cada año. Entre los profesores invitados, recuerdo al Dr. Juan Pablo Pardo, que impartió el curso de cinética enzimática durante ocho años y sólo dejó de hacerlo recientemente porque partió en sabático. El Dr. Edmundo Chávez, que impartió la bioenergética los primeros años, el que suscribe, que en dos periodos de cuatro años cada uno, se hizo cargo de describir la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas dentro del curso de bioquímica coordinado por el Dr. Saavedra. Otros profesores fueron los doctores Efraín Campos, Miguel Angel Gómez Lim, Angélica González Hernández, Félix Gutiérrez Corona, Jorge Herrera Abarca, Edmundo López-Barbosa, Jorge Molina Torres, Antonio Peña, Rubén Salcedo, Estela Sánchez de Jiménez y Jorge Vázquez.

Conforme pasaron los años, algunos profesores ya no pudieron ir a Morelia, pero fueron reemplazados por otros. El Dr. Rafael Moreno, que incluso disfrutó algunos años de una cátedra patrimonial del CONACyT gestionada por el Dr. Saavedra y ahora colabora estrechamente con el Dr. Carlos Cervantes. El Dr. Rafael Villalobos, que pasó un año sabático en la UMSNH y publicó varios artículos en colaboración con varios miembros del IIQB. La lista es grande, también se han incorporado exalumnos y doctores de otros lugares que son mucho más jóvenes que los fundadores y han empezado a impartir cursos, como el M. en C. Victoriano Pérez-Vázquez, egresado de la maestría en ciencias del IIQB, el M. en C. Vicente Castrejón que permaneció en la planta de profesores varios años y el Dr. José G. Sampedro, que es el nuevo profesor de cinética enzimática. Todos estos profesores visitantes complementaron a los profesores que eran quienes impartían gran parte de los cursos y guiaban a los alumnos en sus proyectos de investigación.

Al paso de los años, la maestría se ha reforzado y ahora goza de cabal salud. La Dra. Eva Soriano nos informó que hoy cuentan con trece investigadores de tiempo completo, de los que uno es egresado de la maestría del

propio IIQB. Además, el director actual, el Dr. Rodolfo Farías indica que recientemente recibieron la renovación de su *status* de excelencia en el padrón del CONACyT y ésto durará hasta 2006; este año se inició el programa de doctorado. Se han graduado cuarenta y dos estudiantes y muchos de ellos han ingresado en programas de doctorado en diversas instituciones de la república. En cuanto a ingreso, cada año tienen suficientes aspirantes como para escoger solamente a los mejores.

Enhorabuena: todos los que participamos en la aventura de crear un instituto de ciencias que llevara a cabo investigación de frontera estamos de plácemes y felici-

tamos cordialmente al IIQB. Despedida: en cuanto a los profesores invitados, la necesidad que tiene el IIQB de nuestra ayuda va disminuyendo y eventualmente desaparecerá. Bienvenida: al ver al IIQB entre las instituciones que hacen ciencia biológica de vanguardia en México, sentimos el orgullo de haberlos ayudado al menos un poco. El futuro: el IIQB va a progresar lográrticamente.

Salvador Uribe Carvajal,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
y Profesor Visitante, IIQB de la UMSNH



Comercializadora e Importadora de Productos Químicos, S.A. de C.V.

Proveedores de Insumos Nacionales e Importados para la Industria Farmacéutica, Química, Cosmética, Alimenticia, Hospitalaria e Investigación

- | | | |
|----------------------|----------------|----------------------------|
| * Biología Molecular | * Fibrosis | * Inmunología |
| * Microbiología | * Farmacología | * Validación |
| * Bioquímica | * Virología | * Equipos para Laboratorio |
| * Inmuno química | * Etc..... | |

Somos tu mejor opción, cotizaciones en menos de 24 horas, Excelente tiempo de entrega, contáctanos.

Calle 3 Privada Alicia Mz. 8 Lote 3 Col. Cuchilla Pantitlan, México, D. F.
Tel.5115-4708 Tel./Fax:5758-9726 E-Mail: cipquim@hotmail.com

SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2003

XXX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA,
Organizado por el Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina, U. N. A. M.

Y

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

Fecha: Del 11 al 16 de agosto de 2003.

Lugar: Auditorio Alfonso Caso,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Informes e Inscripciones

Teléfonos: (55) 5623 2170, (55) 5623 2175 y Fax: (55) 5616 2419

Sra. Marivel Rojas García

XXX TAB: comitetab@bq.unam.mx

XI Congreso: reb@laguna.fmedic.unam.mx

Visite nuestra página: <http://bq.unam.mx/%7Eevazquez/tab/>

Más información en la página del depto: <http://bq.unam.mx/>

Comités Organizadores

Del XXX TAB

Dr. Oscar Flores Herrera
oflores@bq.unam.mx

Dr. Héctor Riveros Rosas
hriveros@servidor.unam.mx

Dr. Alejandro Sosa Peinado
asosa@bq.unam.mx

Dr. Edgar Vázquez Contreras
evazquez@bq.unam.m

Del XI Congreso

Dra. Yolanda Saldaña Balmori
balmori@servidor.unam.mx

balmori@bq.unam.mx

Dra. Virginia Sánchez Meza
sanchezvicky@hotmail.com

Dra. Sara Morales López
saramolo@servidor.unam.mx

XXX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, U. N. A. M.
Auditorio Alfonso Caso, del 11 al 14 de agosto de 2003.

PROGRAMA PRELIMINAR.

Lunes 11 de agosto

16:00 hrs Registro e Inscripciones
17:40 hrs Inauguración
18:00 hrs **Dr. Gerardo Jiménez Sánchez**
Investigador (Johns Hopkins University), y Director
Consortio Promotor del Inst. Medicina Genómica
Bases Bioquímicas y moleculares de las enfermedades peroxisomales

Martes 12 de agosto

9:00 hrs **Dra. Marieta Tuena de Gómez-Puyou**
Investigador emérito (Inst. Fisiología Celular-UNAM)
Virtudes y pecados de una enzima: la ATP sintasa

10:10 hrs **Dra. Bertha González Pedrajo**
Investigador (Yale University)
Sistemas de secreción de proteínas en bacterias: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia

11:40 hrs. **Dr. José Federico del Río Portilla**
Investigador (Inst. Química-UNAM)
¿Cómo se determinan estructuras de proteínas por Resonancia Magnética Nuclear?

12:50 hrs **Dr. Armando Gómez-Puyou**
Investigador emérito (Inst. Fisiología Celular-UNAM)
La relación entre flexibilidad y catálisis en las enzimas

Miércoles 13 de agosto

9:00 hrs **Dr. Jorge Ramírez**
Director de la Unidad de Microarreglos-UNAM
Microarreglos de DNA

10:10 hrs **Dr. Enrique Piña**
Profesor emérito, Depto. Bioquímica, Fac. Medicina-UNAM

¿Es tóxico el etanol?

11:40 hrs. **Dr. Ernesto Maldonado**
Investigador (Inst. Fisiología Celular-UNAM)
Experimentación en el pez cebra: Un modelo para la biología del desarrollo

12:50 hrs. **Dra. Rosa Navarro**
Investigador (Inst. Fisiología Celular-UNAM)
Mecanismos de regulación en el mantenimiento de la línea germinal de C. elegans

Jueves 14 de agosto

9:00 hrs. **Dr. Ranulfo Romo**
Investigador (Inst. Fisiología Celular-UNAM)
Neurobiología de la toma de decisiones

10:10 hrs. **Dr. Diego González-Halphen**
Jefe del Depto. Genética Molecular, Inst. Fisiología Celular-UNAM
Lo que el núcleo se llevó

11:40 hrs. **Dr. Alfonso León del Río**
Investigador (Inst. Investigaciones Biomédicas-UNAM)
Supervivencia cerebral y mecanismos de regulación transcripcional por vitaminas

La entrada a las Conferencias es LIBRE con registro.

Cuota de recuperación: \$300.00 M.N. (hasta el 15 de julio) y \$350.00 M.N. (después del 15 de julio).
La cuota de recuperación incluye: Volumen XXVII del libro MENSAJE BIOQUÍMICO, material de papelería e inscripción al Curso/Taller de Educación Bioquímica en el aula 5 de cómputo de la Fac. Medicina, UNAM.
(mayores informes en nuestra página en Internet): <http://bq.unam.mx/%7Ecomiteta/>

Curso/Taller de Educación Bioquímica
12 al 13 de agosto

16:00 – 20:00 hrs. **Act. Iliana Cuenca Almazán**
Consultora de Sistemas (Univ. Autónoma Edo. Morelos)
Hipertexto sin pretextos. El uso de la tecnología para el aprendizaje de la ciencia

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

La Semana de Educación Bioquímica 2003, que se realizará en el Auditorio Alfonso Caso en la Universidad Nacional Autónoma de México del 11 al 16 de agosto del presente año, reúne en sus actividades al XXX Taller de Actualización Bioquímica que organiza el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM y el XI Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. que en esta ocasión tiene como tema central: **“Diagnóstico de la Enseñanza de la Bioquímica en México”** en el que habrá conferencias magistrales y presentaciones libres e iniciará el jueves 14 por la tarde y se clausurará el sábado 16 al mediodía.

Una de las funciones de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C., es la de dar servicio e información tanto a sus Asociados como a los que no lo sean, en lo relacionado con el tema, ya sea con la publicación de la Revista de Educación Bioquímica, con la organización del Congreso Anual o proporcionando asesoría a aquellos que la soliciten.

La Asociación tiene el compromiso ante los bioquímicos del país, de poseer y en su caso, proporcionar información de las universidades o centros de enseñanza superior en donde existan las carreras de Agronomía, Biología, Ciencias Químicas, Enfermería, Medicina, Nutrición Odontología, Psicología, Veterinaria, u otra en donde se enseñe bioquímica.

Por tal razón es importante conocer las características de la materia de Bioquímica en las diferentes escuelas o facultades del campo biológico arriba mencionadas, tal es el caso de: A) Los planes de estudio, B) Los diferentes programas, C) La duración de ellos, D) Los materiales de apoyo (libros, prácticas u otros), E) Los índices de inscripción, F) Los

porcentajes de acreditación, G) De reprobación, H) De deserción, etc.

Para realizar el diagnóstico propuesto y con la finalidad de dar mejor servicio, nos estamos dirigiendo por este conducto a todos los involucrados en el proceso: ya sean directivos de la correspondiente carrera, jefes de Departamento de Bioquímica, coordinadores de la materia, organizadores de curso y profesores, para invitarles a que participen en el XI Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. presentando sus datos ya sea en forma oral o en cartel.

Para la participación es indispensable, además de realizar el pago correspondiente a su inscripción, enviar un resumen que deberá ser escrito en letra Times New Roman de 10 a 12 puntos, con una extensión máxima de una cuartilla, a espacio sencillo y con un margen de 2.5 cm por lado. En el resumen se debe especificar: título (a mayúsculas y en negritas), autores y adscripción, introducción, contenido, resultados, discusión y conclusiones. Le pedimos cuidar su presentación y ortografía pues los resúmenes serán publicados en las memorias que se elaborarán en ocasión del XI Congreso tal y como se envíen.

Al original de su trabajo, el cual no deberá tener borrones ni tachaduras, se anexarán tres copias del mismo, además de la forma de registro y de la fotocopia del pago de su inscripción al Congreso que deberá enviarse sin doblar por correo al apartado postal de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica o entregarlos personalmente a la Sra. Marivel García Rojas, en las oficinas de la Asociación en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. No se aceptarán envíos por Fax. Se

sugiere que la presentación del resumen se apegue al siguiente ejemplo:

LAS PRÁCTICAS COMO APOYO A LA ENSEÑANZA DE BIOQUÍMICA EN LA UNIVERSIDAD DEL DESIERTO.

(renglón libre)

Mario Reyes Carrillo, Carolina Lozano Anaya y Ana Báez Lira. Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad del Desierto. Av. Risco No. 22, Peñasco, S. L. P.

(renglón libre)

RESUMEN...

Fecha límite para el envío de resúmenes: **4 de julio de 2003.**

Costos:

Renovación de Membresía para Socios de la A. M. P. B., A. C.	MN	\$ 150.00
Participación en el XI Congreso de la A. M. P. B., A. C.	MN	\$ 150.00
Total	MN	\$ 300.00
Registro de Membresía como nuevo Socio de la A. M. P. B., A. C.	MN	\$ 200.00
Participación en el XI Congreso de la A. M. P. B., A. C.	MN	\$ 200.00
Total	MN	\$ 400.00
No Socios inscritos al XI Congreso de la A. M. P. B., A. C.	MN	\$ 200.00

El pago deberá hacerse en sucursales del Banco BBVA Bancomer a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. en la cuenta No **0133718123** Sucursal Perisur (**3517**)

Enviar sus resúmenes a: Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C.

Apartado Postal 70-281, C. P. 04510, México, D. F.

o entregar a Sra. Marivel Rojas García en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

INFORMES: reb@laguna.fmedic.unam.mx

Teléfono: 01 (55) 5623-2170 Fax: 01(55) 5616-2419

COMITÉ ORGANIZADOR DEL CONGRESO

Dra. Yolanda Saldaña Balmori
balmori@servidor.unam.mx

Dra. Virginia Sánchez Meza
sanchezvicky@hotmail.com

Dra. Sara Morales López
saramolo@servidor.unam.mx

46

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

FORMA DE REGISTRO

Nombre _____ Apellidos _____

Miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. Si No

Jefe de Departamento Coordinador de la materia Profesor

Nombre de la materia _____

Departamento _____

Escuela o Facultad _____

Universidad _____

¿Conoce la Revista de Educación Bioquímica (antes Boletín de Educación Bioquímica)? Si No

¿La recibe? Si No

En caso de recibirla ¿le interesaría seguirla recibiendo? Si No

En caso de no recibirla ¿Le gustaría recibirla? Si No

Domicilio Institucional

Calle y Número _____

Colonia _____ Ciudad _____ Estado _____

C. P. _____ Teléfono _____ Fax _____

Correo E: _____

Domicilio Particular

Calle y Número _____

Colonia _____ Ciudad _____ Estado _____

C. P. _____ Teléfono _____ Fax _____

Correo E: _____

Sitio donde desea recibir su correspondencia: Domicilio Institucional Domicilio Particular

Trabajos enviados al Congreso

Número de resúmenes enviados: _____

Título de el o los trabajos: _____

Indique la forma en la que desee hacer su presentación: Oral Cartel Indistinto

Pago realizado a la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. MN \$ _____


REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB)**COMITÉ EDITORIAL****ACTUALIZACIÓN DE DATOS DE LOS SUSCRIPTORES**

Por favor sea tan amable de llenarlo a máquina y enviarlo a la brevedad posible al APARTADO POSTAL 70-281, Coyoacán 04510, D.F., o por FAX al siguiente número: 5616-2419

NOMBRE COMPLETO: Apellido paterno _____
Apellido materno _____
Nombre(s) _____

DOMICILIO: Calle _____ Número _____ Apdo Postal _____
Colonia _____
Delegación o municipio _____
Ciudad _____
Estado _____
Código Postal _____
País _____

TELÉFONOS Y FAX: Domicilio _____
Oficina _____

INSTITUCIÓN DONDE TRABAJA _____

Nombramiento _____

FIRMA _____ **FECHA** _____

CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C o suscriptor de la REB 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 la REB sea leída.

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 de la REB 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. Iniciarán 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 de la REB de su localidad y comunicación inmediata de los cambios en él.

5.1.c) Colaboración en la promoción, difusión y distribución de la REB 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 de la REB, Apartado Postal 70-281, México, 04510, DF, MEXICO, o bien al Tel: (52) 5623-2168 / Fax: (52) 5616-2419.

email: balmori@laguna.fmedic.unam.mx

Yolanda Saldaña Balmori

Coordinadora de Corresponsales de la REB

INTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

La REB 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:

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). Este deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo y de la solicitud para su publicación, firmada por cada uno de los autores.
- 2) El trabajo debe iniciarse con el título del artículo, nombre de los autores, iniciando por nombre propio completo y marcado como pie de nota, la afiliación del o los autores (por ejemplo: departamento e institución), domicilio, código postal, ciudad, estado, país, teléfono, fax y correo electrónico en caso de tenerlos. 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 última páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:

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

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

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The molecular biology of immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John 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 albanen con tinta china o bien impresiones láser o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localiza-

ción 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 2002. 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 1-1.
- 4) Se aceptará un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto según el inciso 1-4. 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 1-5.

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 a la Revista de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal de la REB en su localidad.