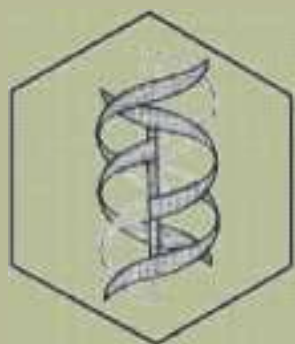


REB 2006

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la
**Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, A.C.**

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM



Facultad de Medicina
UNAM



Sociedad Mexicana de
Bioquímica, A.C.

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

VOL. 25

No. 1

MARZO 2006

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

GRACIELA MEZARUIZ

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

JORGE JOEL REYES MÉNDEZ

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

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 Investigaciones Biomédicas, UNAM e
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
"Salvador Zubirán"

ANACECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL

Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Cardiología
"Dr. Ignacio Chávez"

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

ASISTENTE EDITORIAL

MARIVEL ROJAS GARCÍA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Coordinadora
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

MARÍA DE LOS ANGELES BOFFILL CÁRDENAS

Facultad de Ciencias Médicas
Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba

CARLOS CERVANTES VEGA

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO

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

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

SERGIO SÁNCHEZ-ARMÁSSACUÑA

Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos Periódica, Iresie y Latindex.

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), publicación trimestral. La presentación y disposición en conjunto y de cada página de la Revista de Educación Bioquímica son propiedad del editor. Derechos reservados © Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Queda estrictamente prohibida la reproducción parcial o total por cualquier sistema o método mecánico o electrónico sin autorización por escrito del editor. Certificados de: Licitud de Título: 12000; Licitud de Contenido: 8397, expediente No. 1/432"2"/15792; Reserva al título en Derechos de Autor No. 04-2002-030616225500-102. (ISSN: 1665-1995); Reserva de título en Derechos de Autor para publicación electrónica No. 04-2005-092612014100-203 (ISSN: 187-3690). Diseño: Celia Virginia Sánchez Meza; Tiraje 750 ejemplares. Impresión: Departamento de Impresos de la Facultad de Medicina, UNAM. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg. No. PP09-1001; UNAM-Departamento de Bioquímica y Facultad de Medicina. Distribución electrónica: Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM (<http://computo.sid.unam.mx/Bioquimica> o bien <http://www.puis.unam.mx>). Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C. P. 04510, México, D. F. Correo electrónico reb@bq.unam.mx.

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

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

LA DIVULGACIÓN DE LA CIENCIA

José Víctor Calderón Salinas.....1

ARTÍCULOS

DETERMINACIÓN DE LA TOPOLOGÍA DE TRANSPORTADORES BACTERIANOS

Rafael Jiménez y Carlos Cervantes.....3

INICIO DE LA TRADUCCIÓN DEPENDIENTE DE IRES: UN MECANISMO ALTERNATIVO PARA LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Ana Lorena Gutiérrez-Escolano.....12

CANALES MITOCONDRIALES DE POTASIO SENSIBLES A ATP Y CARDIOPROTECCIÓN

Gerardo de Jesús García-Rivas.....20

OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO DETERMINACIÓN DEL PASO LIMITANTE EN ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS ATÍPICAS DE *Escherichia coli*

José Salud Rodríguez Zavala.....26

CRUCIBIOQ CUERPOS CETÓNICOS

Yolanda Saldaña Balmori.....28

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

José Salud Rodríguez Zavala.....30

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ

Yolanda Saldaña Balmori.....32

CONVOCATORIAS

SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.
XIV CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN
MEXICANA DE PROFESORES DE
BIOQUÍMICA, A.C.....33

XXVI CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD
MEXICANA DE BIOQUÍMICA, A. C.37

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....38

EDITORIAL

LA DIVULGACIÓN DE LA CIENCIA

La divulgación científica es una forma de comunicación dirigida a las diferentes esferas de la población, para darle un acceso fácil, rápido y veraz a conocimientos y conceptos científicos; desplazando las explicaciones empíricas y mágicas de los fenómenos, por conocimientos que explican los marcos de referencia y los paradigmas en los que se basa nuestro actual entendimiento racional del universo y fomentando el empleo del razonamiento lógico para la resolución de los problemas y el entendimiento de la naturaleza.

Si bien la actividad científica es en sí misma una tarea que tiene serias dificultades en su consecución y mantenimiento, la divulgación de los conocimientos científicos no es menos complicada y en varias formas tiene aristas que la complican aun más. Para divulgar los conocimientos científicos nos enfrentamos por lo menos a tres grandes problemas: la falta de preparación de los investigadores y académicos para comunicar a un público no especializado los conceptos tan especializados que se emplean en la ciencia, la falta de estructuras administrativas que promuevan la divulgación y el bajo nivel educativo y la nula cultura científica de la población en general.

En nuestro país es muy poca la cantidad de materiales destinados a la divulgación de la ciencia en general y todavía más baja la cantidad de materiales empleados para la divulgación de los resultados de la ciencia nacional. Una buena parte de los materiales de divulgación son traducciones extranjeras, a veces mal hechas y cuya distribución está muy limitada en cualquiera de los medios. Sólo algunos ejemplos pueden rescatarse como loables esfuerzos por realizar esta actividad. Es claro que nuestros medios de difusión buscan una ganancia económica, que depende del impacto en la población y que difícilmente se encontrarán medios involucrados de manera altruista en la formación y educación. En este sentido, el medio se enfrenta no solo a que el comunicador logre tener un lenguaje accesible, un público al que le interese esta información, sino además a contar con el apoyo económico que le permita obtener un producto de calidad. El resultado es la pobre divulgación de la ciencia que tenemos en el ámbito nacional. Lo anterior deja la tarea casi exclusivamente a las instituciones educativas públicas y a otras dependencias del estado y siempre con la amenaza de que el primer ajuste de presupuesto afectará esta actividad, ya de por sí marginada.

La finalidad filosófica del trabajo científico es conocer e interpretar el universo, arrancarle sus más íntimos secre-

tos y con ello incidir en el corto o largo plazo en mejorar la calidad de vida de la humanidad. Sin embargo, esta consideración filosófica, si bien totalmente cierta, es frecuentemente mal entendida, no solo en objetivo, sino también en tiempo y en espacio.

Los problemas de no entender las posibilidades y alcances de la finalidad científica tienen serios impactos en el reconocimiento de la ciencia como una actividad estratégica para el desarrollo de un país, pero también provoca una baja aceptación y notables confusiones en la población que espera, al igual que las esferas gubernamentales o los niveles empresariales, resultados rápidos, contundentes, baratos y que en no pocas ocasiones, estén de acuerdo con su concepción de la realidad, o que confirmen sus sospechas intuitivas o sus ideas preconcebidas.

Cuando se sabe que alguien se dedica a la investigación científica, de inmediato se generan diferentes preguntas que pueden ir desde el origen de la vida, pasar por los hoyos negros y alcanzar cuestionamientos sobre ovnis o aspectos de la vida después de la vida y en ocasiones se propone al investigador que estudie una planta que puede combatir al cáncer. Si ante tales cuestionamientos el investigador científico responde con su entrenamiento en el método científico, en base a sus premisas y el razonamiento lógico y declina hablar de lo que no es experto o peor aún, habla técnicamente sobre un fenómeno y expresa posibilidades, probabilidades o en el extremo confiesa el desconocimiento del caso; al instante se convierte en una plática aburrida, o incomprensible o se cuestiona si en verdad sabe algo sobre algún tema.

Cuando se comunica algo a través de una entrevista o directamente en algún material de divulgación, también se altera notablemente el mensaje. Si por ejemplo, se comunica que en ratas embarazadas y expuestas a plomo algunos estudios indican que incrementar la concentración de calcio en la dieta aumenta la cantidad de plomo que circula en la sangre; se piensa y se acepta de inmediato que el calcio en la dieta es malo para las mujeres embarazadas y que debe prohibirse y se hacen una serie de deducciones, inducciones o analogías, con premisas equivocadas que llevan a tener la información como un hecho contundente, un hallazgo invariable y que se aplica a las mujeres embarazadas en todo el país; sin entender que se trata de un paso más en el largo camino de la generación de un conocimiento que pueda ser aplicado directamente en una conclusión que afecte al ser

humano y que además sea veraz y que pueda usarse sin riesgo o con todos los riesgos calculados y asegurados para su uso en el humano.

Lo anterior habla, evidentemente, de la falta de cultura científica que se tiene en todos los niveles de la población, lo que lleva a fincar falsas expectativas en el trabajo científico y la creencia de que se puede plantear un problema general y tener la respuesta en unos días. Esto mismo ocurre y constituye un serio problema con los administradores del presupuesto del estado y los tomadores de decisiones de la inversión y la inyección de dinero fiscal al desarrollo y apoyo de la ciencia y también de los empresarios e industriales, todo lo cual frena el desarrollo de la ciencia por falta de dinero del estado o de inversión privada ya que todos los sectores quieren ver resultados concretos, en el corto tiempo y con la mínima inversión (lo cual abordaremos en otro momento).

Por ahora nos preocupa que ante la necesidad de comunicar los avances de una investigación, en lugar de escribir en párrafos sencillos, concretos y claros, terminemos con textos muy técnicos, con marcos de referencia muy complicados y con aplicaciones de muy largo alcance. O en el otro extremo, datos muy simplificados, donde se deben de explicar incluso conocimientos muy básicos, como los que se estudian a nivel secundaria, con conclusiones imprecisas, con grandes lagunas, que fácilmente se rellenan con mentiras o verdades a medias.

Gran parte del problema es la mala preparación, la poca afición a la lectura y por ende la falta de información y la nula cultura científica que tiene la población en general, incluyendo a los profesores de todos los niveles educativos. Sin embargo, cambiar la cultura científica de un país no es nada fácil y menos a corto plazo, por lo que los investigadores y los encargados de la educación deben sumar esfuerzos para lograr hacer el ansiado cambio a una población más y mejor informada, indispensable en el avance de cualquier país que aspira competir en un mundo globalizado.

Si bien la generación del conocimiento científico y su difusión en revistas de circulación internacional es de importancia fundamental para los científicos, el divulgar los logros y avances de lo que se realiza es importante y necesario para que los conocimientos se integren a las diferentes estructuras nacionales para su aprovechamiento en el país, lo cual dará cuenta a la ciudadanía y a los administradores de la ciencia que el dinero fiscal o de desarrollo está invertido correctamente; y esta comunicación va más allá de los reportes oficiales y técnicos y requieren llegar a reportes de difusión o divulgación nacionales, que en verdad impacten y sean entendidos por la población no experta y que le den sentido a la actividad en el país y para el país.

Aun cuando todos reconocemos la importancia de la divulgación de la ciencia, la misma no solo no se fomenta, sino que incluso se obstaculiza de diferentes formas. Por

un lado tenemos a los propios investigadores científicos, que enfrentan serios problemas por la falta de preparación en materias que permitan la introducción, la facilitación e incluso, en su caso, la profesionalización de esta actividad, que fluctúa entre literaria, educativa, didáctica y científica; dificultades por las cuales buena parte de los investigadores pierden el interés por difundir los conocimientos en los que son expertos. Sin embargo, lo hasta ahora mencionado no pretende ser una crítica fácil y general; debemos de reconocer lo verdaderamente difícil que representa la tarea de modificar un lenguaje tan preciso, como lo es el lenguaje científico y llevarlo a un plano coloquial, peor aun cuando tratamos con los conceptos, en los cuales se tiene que referir a elementos sencillos, conocidos y susceptibles de entender por una persona que no tiene una base de conocimientos necesarios para tener un marco de referencia y con ello entenderlos de manera adecuada.

Aun con las dificultades del caso, existen múltiples investigadores, académicos y comunicadores que tratan de hacer un esfuerzo por divulgar los conocimientos científicos emanados de la ciencia mexicana; evidentemente algunos lo hacen mejor que otros, en nuestra particular opinión, pero lo loable aquí, es el esfuerzo y el trabajo invertido para concretarlo, así como la preocupación por hacerlo. Lo malo, es que aun cuando se reconoce su utilidad, necesidad y dificultad, no se tiene un estímulo administrativo a su realización, ya que los diferentes sistemas de evaluación científica no los reconoce o los califica muy por debajo de otras actividades académico-científicas, desincentivando su realización, por decir lo menos, si no es que bloqueándola. Es curioso que esta actividad es limitada precisamente por aquellas instancias administrativas que deberían de estimularla como una de las tareas fundamentales, que es informar a la población y verter los conocimientos científicos de la manera más simple posible.

Bajo este contexto es claro que la actividad de divulgación de la ciencia seguirá siendo por mucho más tiempo una tarea que estará reservada para los científicos, académicos y comunicadores que tienen la certeza de que ésta es necesaria y parte del trabajo científico. Actividad que tiene que realizarse para incidir en la población, en su educación y sobre todo en su formación y que aun sin que el esfuerzo necesario para llevarla a cabo se reconozca en su justa medida, estará dispuesto a trabajar y continuar con una tarea de gran trascendencia y que le da forma a la finalidad filosófica de la investigación científica. Gracias a todos los que realizan esos esfuerzos y nuestros votos para que cada vez más personas se integren a los mismos en el bien del desarrollo de la ciencia, el conocimiento y la educación.

José Víctor Calderón Salinas
Editor en Jefe

DETERMINACIÓN DE LA TOPOLOGÍA DE TRANSPORTADORES BACTERIANOS*

Rafael Jiménez y Carlos Cervantes¹

RESUMEN

Los transportadores de membrana son proteínas que desempeñan papeles esenciales para el adecuado funcionamiento de todos los organismos vivos. En las bacterias, la captación de nutrientes y la expulsión de sustancias nocivas se encuentran entre sus funciones principales. La estructura de los transportadores está dada en gran parte por sus interacciones con la membrana celular, por lo que el análisis topológico, esto es, la determinación del número y la orientación de los segmentos transmembranales (STM) con respecto a la bicapa lipídica, es fundamental para comprender su función. La información sobre la topología membranaral puede usarse para la identificación de residuos esenciales o para conocer el origen evolutivo de los transportadores. Se ha diseñado una variedad de métodos bioquímicos para el estudio de la topología de las proteínas de membrana. Estos métodos se basan en modificaciones genéticas que permiten distinguir la localización en la membrana de regiones específicas de las proteínas en estudio. En este trabajo se resumen los hallazgos reportados sobre la topología de transportadores bacterianos, con énfasis en los sistemas que transportan iones inorgánicos. De un total de 111 transportadores analizados, destacan dos grupos: uno que atraviesa una sola vez la membrana y otro grupo que posee 12 STM; además, hay varias proteínas con 4, 6, 8 ó 10 STM.

PALABRAS CLAVE: Transportadores de membrana, topología membranaral, bacterias.

ABSTRACT

Membrane transporters are proteins that play essential roles for the adequate functioning of all living organisms. In bacteria, nutrient uptake and extrusion of toxic compounds are among the main functions of these proteins. The structure of transporters is mainly given by their interactions with the cell membrane, thus making topological analysis, i.e. determination of the number and orientation of transmembrane segments (TMSs) with respect to the lipid bilayer, fundamental to understand their function. Information on membrane topology may be used for the identification of essential residues or as an approach to understand the evolutionary origin of transporters. A variety of methods has been designed to study the topology of membrane transporters. These methods are based on genetic modifications that allow to locate specific regions of the protein of interest within the membrane. In this work we summarize the reported findings on the topology of bacterial transporters, with emphasis on systems transporting inorganic ions. Of a total 111 transporters studied, two groups predominate: one that crosses only once the membrane and another group possessing 12 TMSs. In addition, many proteins contain 4, 6, 8 or 10 TMSs.

KEY WORDS: Membrane transporters, membrane topology, bacteria.

INTRODUCCION

Como todas las células, las bacterias poseen membranas que aíslan el citoplasma del ambiente exterior y donde reside la permeabilidad selectiva, propiedad vital para los organismos vivos. Las membranas

biológicas son estructuras complejas constituidas principalmente por una bicapa lipídica y por numerosas proteínas asociadas a ella. Algunas proteínas interaccionan sólo en forma parcial con los lípidos de la membrana y se denominan proteínas periféricas;

estas proteínas, en consecuencia, sólo están expuestas a una de las caras de la membrana. En contraste, las proteínas integrales cruzan la membrana, interaccionando con ambas caras de la bicapa. Las proteínas integrales de membrana contienen una

*Recibido: 14 de junio de 2005 Aceptado: 22 de noviembre de 2005

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B-3, Ciudad Universitaria. Morelia, Michoacán. Tel/Fax: (443) 326-5788. ¹ Autor responsable Correo E: cvega1999@yahoo.com

elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos. Estos residuos no polares se localizan principalmente en las regiones de la proteína que se encuentran inmersas en la membrana.

Las proteínas integrales de la membrana desempeñan papeles esenciales para el funcionamiento de los organismos vivos. Una de las funciones fundamentales de estas proteínas es el transporte. Las proteínas involucradas en el transporte, o transportadores, permiten la captación de nutrientes, la excreción de productos finales del metabolismo y de otras sustancias nocivas, además de la comunicación entre las células y su entorno. Los transportadores también participan en procesos que generan o consumen energía. Así, por ejemplo, los sistemas primarios de transporte activo emplean la energía generada por la hidrólisis del ATP para promover la acumulación o la expulsión de solutos o para impulsar el flujo de electrones en contra de un gradiente electroquímico. La translocación unidireccional de sustratos cargados llevada a cabo por estos transportadores origina potenciales electroquímicos que pueden ser utilizados por los transportadores secundarios para facilitar el movimiento de otros solutos a través de la membrana.

El conocimiento de la estructura de los transportadores es necesario para una completa comprensión de su función, por ello, en este trabajo se analizan las estrategias bioquímicas y moleculares que han sido empleadas para el establecimiento de la topología membranar de los transportadores bacterianos.

TOPOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA

El conocimiento de la estructura proteica es sin duda esencial para entender su función. La estructura tridimensional de muchas proteínas solubles ha sido dilucidada gracias al

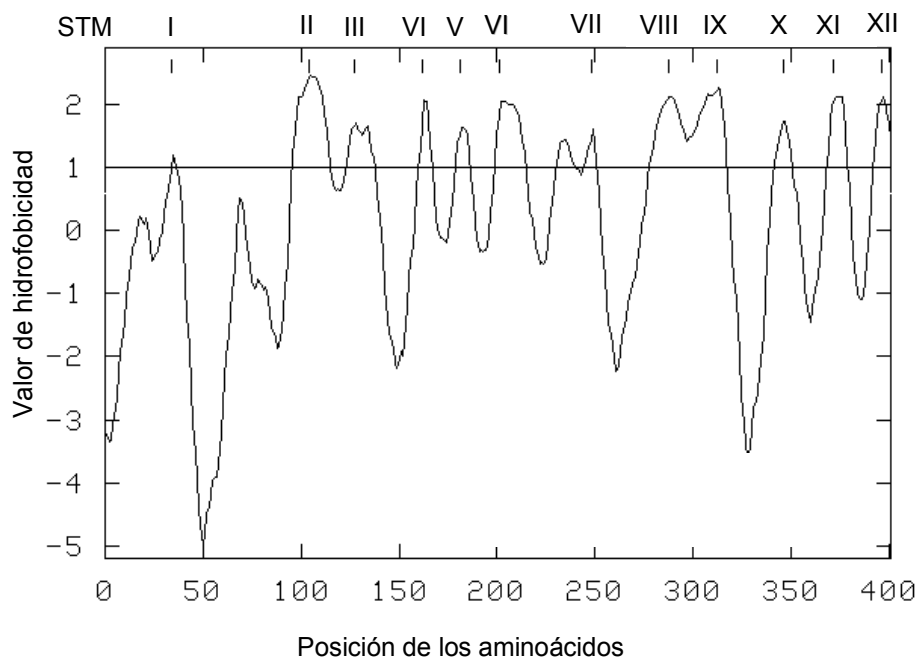


Figura 1. Análisis de hidrofobicidad de una proteína de membrana (perfil hidropático). La localización de probables segmentos transmembranales (STM) se indica con los números romanos de la parte superior, que corresponden a los picos de hidrofobicidad con un valor superior a 1.0. La proteína hipotética de 400 aminoácidos mostrada probablemente posee 12 STM.

empleo de métodos cristalográficos. Debido a la dificultad de generar cristales de proteínas de membrana, sólo se conoce la estructura detallada de un pequeño grupo de estas moléculas. Un aspecto importante de la estructura de las proteínas de membrana es la topología membranar, esto es, el número y la orientación de los segmentos de la proteína que atraviesan la bicapa lipídica. Las proteínas bitópicas de membrana, por ejemplo, poseen un solo segmento transmembranar (STM) que conecta dos dominios de la proteína localizados en ambos lados de la membrana. En el caso de las proteínas politópicas, varios STM atraviesan la membrana.

Aunque las proteínas de membrana muestran una estructura muy variada, se han identificado ciertos rasgos comunes entre ellas, sobre todo los relacionados con sus interacciones con el ambiente hidrofóbico en que habitan. Un factor importante para el acopio de esta información ha sido el gran

número de secuencias de proteínas de membrana que ha aparecido en la literatura reciente, como resultado de la secuenciación de los genomas completos de diversos organismos. Entre las características comunes de las proteínas de membrana resalta que los STM son por lo general, tramos de 20 aminoácidos, en su mayoría de naturaleza hidrofóbica, que adoptan estructuras de hélice α . Estas hélices se encuentran inmersas en la membrana manteniendo una orientación perpendicular con respecto al plano de la bicapa. Los STM están unidos entre sí por asas extramembranales de tamaño variable y compuestas principalmente por aminoácidos hidrofílicos.

Como ocurre con todas las membranas biológicas, las membranas bacterianas son estructuras asimétricas; esto es, las caras interna y externa presentan una diferente composición de lípidos y de proteínas y están expuestas a ambientes acuosos distintos: en el caso de la membrana interna, al cito-

plasma, y en el de la membrana externa, al espacio periplásmico. Se ha postulado que la distribución de las asas hidrofílicas de las proteínas de membrana obedece la llamada regla de "positivos adentro" (1), que señala que las asas no translocadas, o citoplásmicas, muestran una mayor proporción de aminoácidos con carga positiva (principalmente arginina y lisina), en comparación con las asas que son translocadas al periplasma.

ANÁLISIS TOPOLÓGICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

El papel de las proteínas de membrana depende en gran parte de sus interacciones con la fase lipídica, por lo que la determinación de su topología es importante. La topología de una proteína permite conocer la localización de residuos o regiones esenciales, ya sea para la función o para mantener la estructura correcta de la proteína en estudio. Un primer paso para este fin es la localización de regiones hidrofóbicas en la secuencia de aminoácidos. Esto se logra mediante la obtención de un "perfil hidropático", empleando programas de computadora (2). El perfil hidropático es un análisis del grado de hidrofobicidad que presenta una proteína a lo largo de su secuencia de aminoácidos (Fig. 1). Este perfil permite identificar regiones o dominios hidrofóbicos que representen STM potenciales, así como localizar las posibles asas hidrofílicas que los conectan.

Para predecir la orientación precisa de los probables STM se han diseñado y aplicado diversos métodos que modifican las proteínas, generalmente mediante la manipulación del gen correspondiente. Los principales métodos empleados se describen a continuación.

A) Fusiones traduccionales con proteínas reporteras

En las fusiones génicas, el gen que

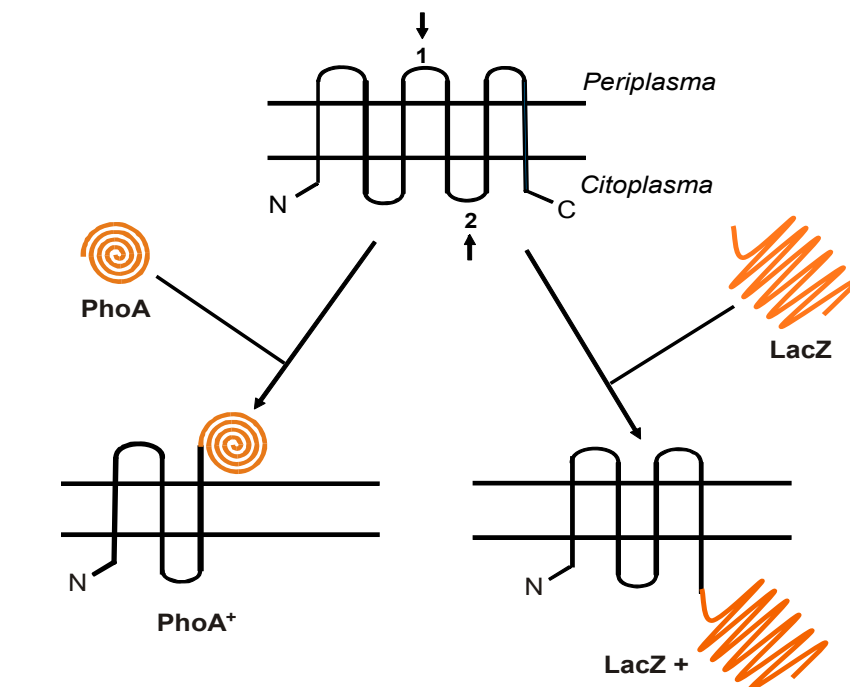


Figura 2. Fusiones traduccionales con las proteínas reporteras fosfatasa alcalina (PhoA) y β -galactosidasa (LacZ). Se representa una proteína de membrana con seis segmentos transmembranales con los extremos amino y carboxilo terminales en el citoplasma. Una fusión periplásmica en la posición 1 con PhoA produce actividad de fosfatasa alcalina, mientras que una fusión citoplásmica con LacZ en la posición 2 origina actividad de β -galactosidasa. (Adaptada de la referencia 16).

codifica una proteína "reportera" (cuyas propiedades, por ejemplo su actividad enzimática, dependen de su localización celular) se fusiona con el gen de la proteína de membrana en estudio en sitios en los que se predice codifican asas o dominios hidrofílicos. La proteína generada por la fusión es el resultado de la transcripción y traducción de los dos genes, unidos de tal forma que conservan sus marcos de lectura "en fase". Las propiedades de la proteína reportera fusionada resultante indicarán en qué parte de la membrana se localiza el sitio donde ocurrió la fusión (3).

La proteína reportera más utilizada para estudios de fusiones génicas en bacterias es la enzima fosfatasa alcalina (PhoA), codificada por el gen *phoA* de *Escherichia coli*. La forma activa de PhoA se localiza en el espacio periplásmico y se sintetiza como un precursor con una secuencia señal N-terminal que es eliminada durante

su transporte a través de la membrana (4). El plegamiento y ensamble correctos de PhoA ocurren después de su exportación al periplasma, por lo que sólo en este compartimento la enzima es activa (Fig. 2).

Las fusiones con la enzima β -galactosidasa (LacZ), también de *E. coli*, con frecuencia son usadas de manera complementaria a las fusiones con PhoA. A diferencia de PhoA, LacZ sólo tiene actividad enzimática en el citoplasma, debido a que los grupos sulfhidrilo de sus residuos de cisteína permanecen reducidos por el pH más ácido de este compartimento y se oxidan en el periplasma (5). Cuando LacZ se une a una señal de exportación, la enzima queda atrapada en la membrana, lo cual evita su plegamiento apropiado y la enzima es inactiva (3) (Fig. 2). De esta manera, la determinación de la actividad de estos dos enzimas, en fusiones construidas de distintas regiones de la proteína de

membrana en estudio, permite conocer su localización celular.

Una ventaja de estos métodos es que los ensayos enzimáticos son fáciles de realizar al cuantificar los productos de manera sencilla. Además, existe una gran variedad de vectores de expresión para construir las fusiones. Sin embargo, estos procedimientos pueden presentar algunas dificultades, como la alta actividad de PhoA cuando se fusiona en el extremo amino terminal de un asa citoplásmica. Por otra parte, cuando PhoA o LacZ se fusionan dentro de un STM su actividad puede variar y originar resultados confusos.

Otra proteína reportera que se ha empleado como alternativa de PhoA es la enzima β -lactamasa (BlaM). Cuando la enzima se expresa en el periplasma es activa y confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos. En contraste, las células que expresan BlaM en el citoplasma son sensibles a estos agentes. Así, la distinta susceptibilidad a antibióticos de bacterias que expresan fusiones de proteínas de membrana con BlaM se puede usar para determinar su localización. El empleo de esta enzima presenta algunas desventajas que han limitado su uso. Por ejemplo, cuando BlaM se fusiona al extremo amino de un asa periplásmica no confiere resistencia a β -lactámicos; en otros casos, cuando se fusiona a un sitio citoplásmico llega a conferir resistencia a los antibióticos.

Como una alternativa para el análisis de la topología de proteínas de membrana se ha empleado la proteína verde fluorescente (GFP). Esta proteína fluoresce sólo si se encuentra en el citoplasma. La actividad de GFP se produce al excitar con luz ultravioleta el fluoróforo interno localizado en la proteína, lo cual origina la emisión de luz verde que puede ser detectada en un fluorómetro (6). Cuando se fusiona en diferentes sitios de la proteína de membrana en estudio, la fluorescencia

de la GFP se puede usar para localizar regiones citoplásmicas. GFP es una proteína monomérica, lo cual puede representar una ventaja para su expresión sobre LacZ, que es un tetrámero. Este reportero se ha usado aún muy poco para el análisis topológico de proteínas de membrana.

La enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) cataliza la acetilación del cloranfenicol sólo cuando la proteína está en el citoplasma. Esta modificación inactiva al cloranfenicol confirmando resistencia al antibiótico a las bacterias que expresan la enzima. Cuando CAT se fusiona a una proteína de membrana, su localización puede ser determinada con base en la susceptibilidad al cloranfenicol de la bacteria que expresa la fusión (7). Otra enzima reportera, la β -glucuronidasa (GUS), lleva a cabo la hidrólisis de β -glucurónidos sólo cuando se encuentra en el citoplasma. Su actividad es determinada por la velocidad de hidrólisis de sustratos cromogénicos como el p-nitrofenil glucurónido (8). El uso de CAT y GUS es muy reciente por lo que se han utilizado en muy pocos casos para el análisis topológico, no habiéndose aún reportado problemas en su aplicación.

B) Mutagénesis y monitoreo de cisteínas

Debido a que la cisteína posee un grupo R relativamente pequeño e hidrofílico (-SH), su sustitución por otro aminoácido (usualmente serina) es tolerada por la mayoría de las proteínas de membrana, conservando éstas su función. Para el análisis topológico de transportadores se ha empleado el método de monitoreo ("scanning") de cisteínas. Este procedimiento consiste en sustituir mediante mutagénesis todos los residuos de cisteína de la proteína y después reemplazar determinados aminoácidos por nuevas cisteínas. A continuación

se emplean reactivos específicos para grupos sulfhidrilo que permiten conocer la localización del residuo con respecto a la membrana. Los compuestos más utilizados con estos fines son los derivados de la maleimida (Fig. 3), la cual se une formando un enlace de tioéter con los grupos sulfhidrilo. Así, se han usado reactivos permeables o impermeables a la membrana, que contienen biotina o grupos fluorescentes o radioactivos que se pueden detectar por su unión con estreptavidina, por su fluorescencia o mediante autorradiografía. Estos reactivos se usan para cuantificar la accesibilidad del sitio bajo estudio y pueden conducir a su localización celular (Fig. 3). La principal ventaja del método de monitoreo de cisteínas sobre las fusiones traduccionales, es que la proteína se conserva prácticamente intacta con sólo algunas modificaciones menores en su secuencia de aminoácidos que no alteran su topología. La desventaja es que los procedimientos son más complejos y costosos, ya que se requiere la modificación de la proteína por mutagénesis del gen que la codifica y su posterior identificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida o incluso por ensayos de inmunodetección.

C) Inserción de sitios de reconocimiento para anticuerpos o proteasas

Otro de los enfoques empleados para el análisis de la topología de proteínas de membrana hace uso de la inserción de epítomos. Un epítomo es una pequeña región de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo. La inserción de epítomos es útil para obtener información de proteínas de membrana externa, principalmente cuando se desconoce la estructura tridimensional. El método consiste en insertar un péptido reportero corto, correspondiente a un epítomo, en regiones hidrofílicas de la proteína de membrana en estudio; las proteínas por lo general toleran la in-

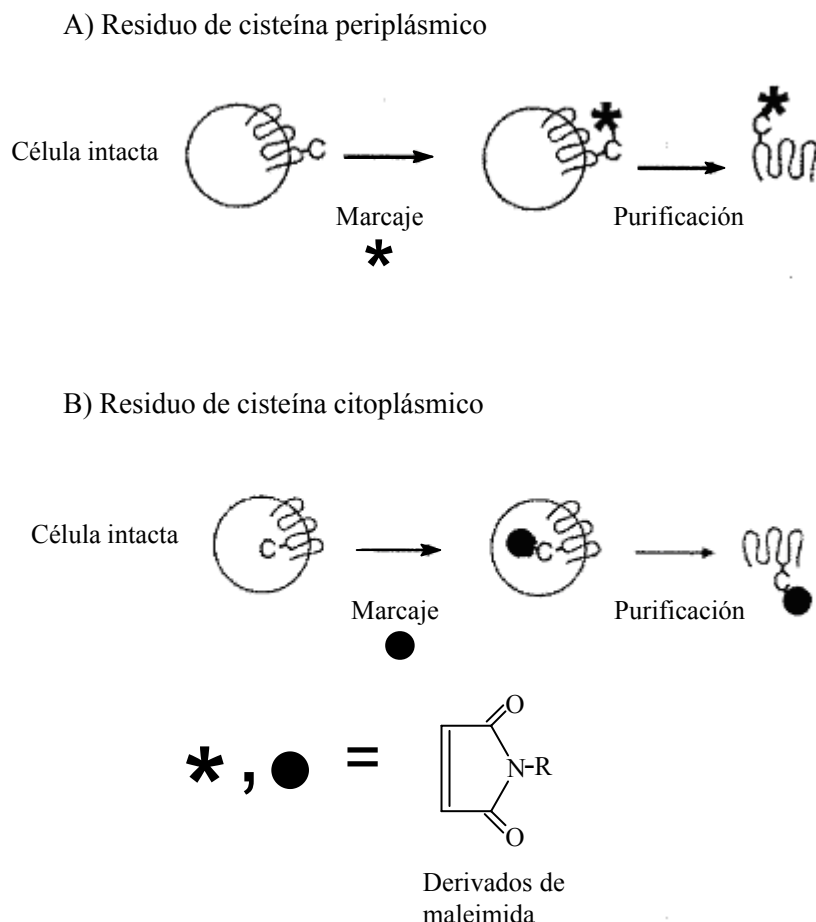


Figura 3. Monitoreo de cisteínas para el análisis topológico de transportadores de membrana. Para la localización de residuos periplásmicos de cisteína (A) introducidos en la proteína de membrana, se pueden realizar ensayos de accesibilidad en células completas utilizando reactivos derivados de maleimida permeables (*) o impermeables (●), en donde ambos compuestos pueden reaccionar con el aminoácido. Para residuos citoplásmicos (B), sólo con derivados permeables de maleimida se podrá marcar la cisteína. En la parte inferior se muestra la estructura de la parte reactiva de los derivados de la maleimida. (Modificado de la referencia 3).

serción sin sufrir cambios drásticos en su estructura y localización celular y, por lo tanto, sin alterar sus propiedades biológicas. La inserción de los epítopos se realiza por medio de mutagénesis dirigida o mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos que codifica el epítipo reportero en el gen que codifica la proteína de interés. Las células que expresan las proteínas híbridas así generadas se ensayan con anticuerpos específicos para el epítipo reportero insertado (9). Con los resultados obtenidos en ensayos de accesibilidad del anticuerpo correspondiente, usando células intactas o vesículas de membrana invertidas, se puede determinar la localiza-

ción del sitio de inserción del epítipo en la proteína de membrana. La ventaja que este método presenta es que la proteína se conserva prácticamente intacta, excepto por la inserción del epítipo; sin embargo, los procedimientos son relativamente complicados y costosos, además de que no todos los epítopos insertados son accesibles al anticuerpo.

Las enzimas proteolíticas o proteasas, catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. Su uso en el análisis de la topología de las proteínas se debe a que las membranas son impermeables a las proteasas. Así, cuando las proteasas se adicionan a suspensiones bacterianas, las regiones proteicas de

la membrana expuestas pueden ser digeridas mientras que los sitios citoplásmicos no son susceptibles a la hidrólisis (3). Los fragmentos producidos por la hidrólisis de las proteínas de membrana se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida y se identifican con anticuerpos específicos para la proteína en estudio mediante inmunodetección. El hecho de que en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de membrana se encuentran comunmente sitios de reconocimiento para ciertas proteasas puede llegar a complicar este análisis. Para resolver este problema, por manipulación genética se pueden insertar sitios de reconocimiento para proteasas específicas en regiones de la proteína expuestas a cualquiera de los dos lados de la membrana. El análisis de los sitios de reconocimiento se puede hacer usando células intactas, para determinar la accesibilidad a los sitios expuestos en el lado exterior de la membrana. Los sitios localizados en el interior se analizan usando vesículas de membrana invertidas. De esta forma, se puede determinar la localización de sitios de reconocimiento insertados en diferentes regiones de la proteína de membrana (10). La presencia de sitios de reconocimiento para proteasas dentro de la secuencia de aminoácidos de algunas proteínas, así como que la proteína se conserva por lo general intacta cuando los sitios son insertados, representan ventajas de la técnica. Las desventajas se relacionan con el hecho de que no todos los sitios son accesibles a las proteasas, por lo que en algunos casos éstos tienen que ser insertados en regiones específicas. Una complicación adicional es que se requiere, por supuesto, tener anticuerpos para la proteína de estudio.

TOPOLOGÍA DE LOS TRANSPORTADORES BACTERIANOS

En nuestro laboratorio estamos tratando de dilucidar la topología

membranal del transportador de cromato ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*, una proteína que confiere resistencia a ese ión tóxico mediante su expulsión del citoplasma (11). Por esta razón se analizaron las proteínas transportadoras de bacterias con topología conocida, así como los métodos que se han usado para su determinación. Con este fin se realizó una búsqueda, que abarcó el periodo de noviembre de 1987 a octubre de 2004, de reportes sobre los transportadores bacterianos que han sido analizados desde el punto de vista topológico y cuyo estudio condujo al establecimiento del número y la orientación de los STM. En muchos de los casos reportados, el análisis topológico ha permitido confirmar la información preliminar obtenida a partir del perfil hidropático, pero también se han descrito ejemplos en los que la información obtenida con este perfil no concuerda con la topología determinada experimentalmente. Para este trabajo se tomaron en cuenta principalmente los transportadores de la membrana interna ya que ahí reside la mayoría de los sistemas de transporte bacterianos importantes desde el punto de vista fisiológico. Además, también se incluyeron las proteínas que, aunque por sí solas no tienen la función de transportador, forman parte de un sistema de transporte membranar.

Se identificó un total de 111 proteínas. Como era de esperar, la mayoría de los transportadores analizados (62 proteínas o 55%) corresponde a proteínas de *E. coli* y le siguen, aunque en menor cantidad, otras bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (nueve proteínas) y *Salmonella typhimurium* (siete proteínas). Sólo nueve transportadores (8%) pertenecen a especies de bacterias Gram positivas.

Con relación a la estrategia experimental elegida, sobresale el uso de los procedimientos que utilizan fusiones con la proteína reportera fosfatasa

alcalina (77 casos o 69%) ya sea sola, en combinación con β -galactosidasa, o con otras reporteras (Tabla 1). Como se mencionó antes, esto probablemente se debe a la sencillez de los ensayos enzimáticos y a la disponibilidad de vectores de expresión para esos genes reporteros. En la Tabla 1 se observa que el uso de fusiones con la β -lactamasa y el monitoreo de cisteínas también han sido empleados con frecuencia.

Para facilitar su análisis las proteínas de membrana se dividieron en dos grupos: en el primero se incluyeron las que tienen la función de transportador por sí solas, excepto aquellas que llevan a cabo el transporte de protones; en el segundo grupo se incluyó a las proteínas que forman canales, a las que forman parte de un sistema de transporte, pero que solas no tienen la función de transportador, y a los transportadores de protones. La exclusión de estas últimas proteínas del primer grupo se debe a que muchas de ellas están formadas por varias subunidades en las que no es claro aún cual lleva a cabo el transporte; además de que el transporte se puede considerar como una función secundaria de estas proteínas, cuya función principal en muchos casos es la transferencia de electrones.

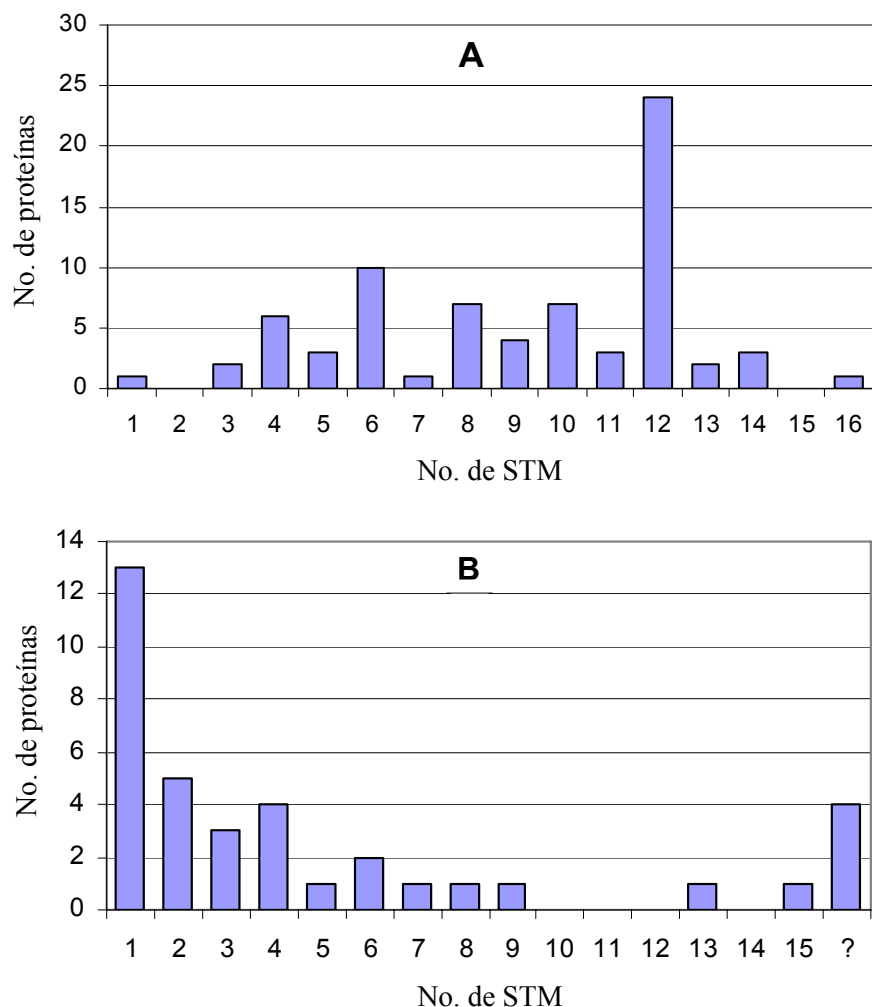
La figura 4 muestra la distribución de los transportadores reportados con respecto al número de STM que poseen. En el primer grupo (Fig. 4A) se encontraron 74 proteínas (66%) donde sobresalen los transportadores con 4, 6, 8, 10 y 12 STM, que comprenden casi la mitad de los ejemplos estudiados (54 casos, o 48%); sólo los transportadores de 6 y 12 STM representan casi un tercio del total (34 proteínas, o 30%). Los datos de la figura 4A acerca de los transportadores con 4, 6, 8, 10 y 12 STM concuerdan con reportes que señalan que los transportadores de la membrana se han originado a partir de la amplificación, probablemente mediante procesos de duplicación génica, de proteínas con dominios más pequeños (12). Se postula que las proteínas más grandes, formadas a partir de una duplicación, adquirieron una mayor especificidad hacia el sustrato a transportar, así como un mejor acoplamiento de energía para llevar a cabo su función. De acuerdo con esta hipótesis, las proteínas de 8 y 12 STM se formaron de la duplicación de dominios de 4 y 6 STM, respectivamente, aunque aún prevalecen estos transportadores pequeños (Fig. 4A). Esta suposición ha sido reforzada por el análisis de las secuencias de

TABLA 1

Métodos usados para el análisis topológico de los transportadores bacterianos analizados en este trabajo

Método	No. de proteínas
PhoA /LacZ	39
PhoA	32
BlaM	15
Monitoreo de cisteínas	10
PhoA con otros reporteros	6
Inserción de epítomos	3
Uso de proteasas	2
Otros	4
Total	111

Abreviaturas: PhoA, fosfatasa alcalina; LacZ, β -galactosidasa, BlaM; β -lactamasa.



?, información no disponible

Figura 4. Distribución de las 111 proteínas de membrana analizadas en este trabajo, con base en el número de segmentos transmembranales (STM). (A) transportadores; (B) proteínas auxiliares de transportadores y canales.

aminoácidos de las mitades amino y carboxilo de algunos transportadores. Por ejemplo, un análisis filogenético de la proteína ChrA de *P. aeruginosa* ha mostrado que algunos aminoácidos, y probablemente ciertos motivos, se conservan de manera simétrica en ambas porciones de la proteína (Díaz-Pérez y col, en preparación); datos similares se han reportado para el transportador de arsénico ArsB (13) y el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ YrbG (14), ambos de *E. coli*.

El segundo grupo de transportadores incluye proteínas con un menor número de STM (Fig. 4B). Se advierte que, excepto un grupo de proteínas que atraviesan la membrana una sola vez

(13 casos, todos caracterizados como proteínas auxiliares de sistemas de transporte), la mayoría contienen 2, 3 y 4 STM. La diferencia en el número de STM, con relación a las proteínas del primer grupo, podría relacionarse con una menor especificidad o con una participación secundaria en el fenómeno de transporte de los transportadores de este segundo grupo.

La distribución de los STM de los transportadores bacterianos en la figura 4 es muy similar a la obtenida por Saier (12) analizando tanto proteínas con topología establecida experimentalmente como predicciones topológicas de transportadores de organismos que abarcan los dominios

Arquea, Eubacteria y Eucaria. Los dos grupos de proteínas, con un bajo o elevado número de STM, están presentes también en ese amplio estudio.

Cuando los transportadores bacterianos reportados se clasificaron de acuerdo con su función específica, se encontró que el grupo principal (con 78 proteínas, o 70%) comprende a los que transportan compuestos orgánicos, entre ellos los que participan en la secreción de proteínas o en el transporte de intermediarios metabólicos. Esta relativa abundancia es probablemente debida a que este tipo de transportadores fisiológicos han sido más ampliamente estudiados.

Un segundo grupo (33 proteínas, o 30%) se relaciona con transportadores de iones inorgánicos (Tabla 2). La gran mayoría (26 proteínas, o 79%) tienen funciones homeostáticas y captan o expulsan cationes fisiológicos (incluyendo protones). En contraste, sólo siete transportadores de este grupo participan en el transporte (expulsión) de iones tóxicos; la mayoría de estos transportadores (cinco ejemplos) se encuentran codificados en plásmidos y constituyen sistemas de resistencia bacteriana. La cantidad de transportadores de iones inorgánicos tóxicos analizados es muy baja debido a que muchos de los sistemas de resistencia aún no se han estudiado con detalle, por lo que se desconoce la topología del transportador. La distribución de la topología de los transportadores de sustratos inorgánicos es muy amplia, desde los que tienen un solo STM hasta los de 15 STM. Entre estos predominan, sin embargo, los que poseen de 8-12 STM (18 proteínas, o 55%; Tabla 2). La amplia distribución de estas proteínas de acuerdo con el número de STM es probablemente debida a que dentro de este grupo se encuentran tanto proteínas que forman canales como transportadores primarios y secundarios.

TABLA 2

Características de los transportadores bacterianos de iones inorgánicos

Nombre	Género	Sustrato (s)	Función	No. de STM*
AmtB	<i>Escherichia coli</i>	Amonio	Captura	11
ArsB	<i>Escherichia coli</i>	Arsenicales	Expulsión	12
ATPasa	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	5
ATPasa	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	8
CadA	<i>Helicobacter pylori</i>	Cadmio	Expulsión	8
CadA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cadmio	Expulsión	8
ChrA	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Cromato	Expulsión	10
ChrA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cromato	Expulsión	12
Citocromo d	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	¿
CorA	<i>Salmonella typhimurium</i>	Magnesio	Captura y expulsion	3
CydA	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	9
CyoA	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	2
CyoB	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	15
CyoC	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	4
CyoD	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	3
CyoE	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	7
CzcA	<i>Ralstonia sp.</i>	Zinc, Cobalto y Cadmio	Expulsión	12
HoxN	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Niquel	Captura	7
Kch	<i>Escherichia coli</i>	Potasio	Captura	6
MgtB	<i>Salmonella typhimurium</i>	Magnesio	Captura	10
MntB	<i>Synechocystis sp.</i>	Manganeso	Captura	9
MntH	<i>Escherichia coli</i>	Manganeso	Captura	11
MotA	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	4
MotB	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	1
MscL	<i>Escherichia coli</i>	Potasio	Captura	2
NhaA	<i>Escherichia coli</i>	Sodio y Protones	Antiportador	12
NhaB	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Sodio y Protones	Antiportador	9
NixA	<i>Helicobacter pylori</i>	Niquel	Captura	8
OadB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sodio	Expulsión	9
ATPasa tipo P	<i>Helicobacter pylori</i>	Cationes	Captura	8
Trans-Hasa	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	13
YrbG	<i>Escherichia coli</i>	Sodio y Calcio	Captura	10
ZntB	<i>Salmonella typhimurium</i>	Zinc	Expulsión	2

*STM, segmentos transmembranales; ¿, información no disponible

Referencias bibliográficas adicionales así como información más detallada acerca de los transportadores que se incluyen en este trabajo se pueden encontrar en: www.tcd.org/ y www.membranetransport.org/

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se estima que 20 a 30% de las proteínas codificadas en el genoma de un organismo son proteínas de

membrana (15), lo que refleja la gran importancia de los transportadores para el funcionamiento celular. Desafortunadamente en las bases de datos, como el Protein Data Bank, se encuentra reportada la estructura tridimensional de sólo cerca de una decena de transportadores. Por esto se ha recurrido a otros métodos para obtener información detallada acerca de su estructura. Una de estas metodologías se basa en la predicción

in silico de estructuras secundarias con base en la secuencia de aminoácidos; sin embargo, ninguno de los métodos de predicción disponibles en la actualidad es absolutamente confiable. Por esta razón, el uso de métodos bioquímicos y moleculares ha sido de gran ayuda para el análisis topológico de los transportadores bacterianos.

Una vez que se tiene la información topológica de una proteína de membrana, se puede proceder a

identificar los aminoácidos relevantes para su estructura o función. Es importante estudiar desde el enfoque filogenético los residuos conservados dentro de la familia a la cual pertenece el transportador. A continuación, esta información puede ser utilizada para llevar a cabo la mutagénesis dirigida de esos residuos con el fin de determinar su papel específico en la función del transportador, ya sea de tipo estructural o participando directamente en la interacción con el sustrato a transportar. Los datos estructurales obtenidos mediante el análisis topológico de los transportadores conocidos se han utilizado para obtener información sobre transportadores homólogos aún no estudiados. También, dado que la homología entre las proteínas indica que éstas provienen de un ancestro común, el análisis topológico de las proteínas de membrana puede ayudar a conocer el origen evolutivo de los transportadores con base en sus características estructurales

REFERENCIAS

1. von Heijne G (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* 225:487-94.
2. Moller S, Croning MD, Apweiler R (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17:646-53.
3. van Geest M, Lolkema JS (2000) Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:13-33.
4. Derman AI, Beckwith J (1991) *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol* 173:7719-22.
5. Snyder WB, Silhavy TJ (1995) Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177:953-63.
6. Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, Webber H, Phillips GJ (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:4068-76.
7. Adler J, Bibi E (2002) Membrane topology of the multidrug transporter MdfA: complementary gene fusion studies reveal a nonessential C-terminal domain. *J Bacteriol* 184:3313-20.
8. Gouffi K, Gerard F, Santini CL, Wu LF (2004) Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. *J Biol Chem* 279:11608-15.
9. Newton SM, Klebba PE, Michel V, Hofnung M, Charbit A (1996) Topology of the membrane protein LamB by epitope tagging and a comparison with the X-ray model. *J Bacteriol* 178:3447-56.
10. Mondigler M, Ehrmann M (1996) Site-specific proteolysis of the *Escherichia coli* SecA protein *in vivo*. *J Bacteriol* 178:2986-88.
11. Aguilera S, Aguilar ME, Chávez MP, López-Meza JE, Pedraza-Reyes M, Campos-García J, Cervantes C (2004) Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 232:107-12.
12. Saier MH Jr (2003) Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol Microbiol* 48:1145-56.
13. Rensing C, Ghosh M, Rosen BP (1999) Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* 181:5891-97.
14. Saaf A, Baars L, von Heijne G (2001) The internal repeats in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger-related *Escherichia coli* protein YrbG have opposite membrane topologies. *J Biol Chem* 276:18905-07.
15. Wallin E, von Heijne G (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 7:1029-38.
16. Manoil C, Beckwith J (1986) A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* 233:1403-08.

INICIO DE LA TRADUCCIÓN DEPENDIENTE DE IRES: UN MECANISMO ALTERNATIVO PARA LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS*

Ana Lorena Gutiérrez-Escolano

RESUMEN

La síntesis de proteínas se inicia por alguno de los dos distintos mecanismos conocidos: el cap dependiente, en donde el ribosoma se une a la estructura cap, presente en el extremo 5' terminal del RNA mensajero (RNAm) y el dependiente de IRES (del inglés: internal ribosome entry site), en el que el ribosoma se une a una región interna del RNAm, cercana al sitio de inicio de la traducción. El IRES, es una secuencia de RNA con estructura secundaria compleja, localizada en la región no traducida (RNT) 5' de algunos RNAm. Los IRES fueron descritos por primera vez en los RNAm virales, los cuales pueden traducirse en ambientes en donde la traducción dependiente de cap está inhibida por efecto de la propia infección. Los RNAm celulares que contienen IRES, se expresan en condiciones semejantes a los IRES virales, como durante algunos estadios de crecimiento y muerte celular, infecciones virales, estrés celular, etc. En estos casos, la traducción dependiente de IRES de algunos RNAm representa una estrategia a prueba de fallas que permite asegurar la sobrevivencia celular o bien la inducción de muerte celular por apoptosis.

PALABRAS CLAVE: Traducción, IRES virales, IRES celulares, eIFs, ITAFs.

INTRODUCCIÓN

La traducción es el mecanismo mediante el cual la información contenida en el RNA mensajero (RNAm) se traduce en proteínas. Ésta consta de tres fases: el inicio, el alargamiento de la cadena polipeptídica y la terminación. El inicio de la traducción en los eucariotes es uno de los procesos más regulados y complejos; en él partici-

pan diversos elementos como el RNAm, numerosas proteínas accesorias llamadas factores de inicio (eIFs) y el ribosoma.

La mayoría de los RNAm de los eucariotes son funcionalmente monocistronicos, esto es, cada RNAm codifica una proteína. Desde el punto de vista estructural, contienen en su extremo 5' terminal una guanina

ABSTRACT

Translation initiates by two distinct mechanisms: the cap-depending scanning where the ribosome binds to the cap structure located at the 5' end of the mRNA and the IRES-dependent translation, where the ribosome binds to an internal region of the mRNA. The IRES is a sequence of RNA with complex secondary structures, located within the mRNA 5' UTR that allows the ribosome to be recruited near the initiation codon. mRNAs with IRES, which were first identified in virus, can be translated when the cap dependent translation has been inhibited, as is the case, during an infection. Some cellular mRNAs also contain IRES and are expressed during cell growth, cell death, viral infections and even under some events of cellular stress. During these conditions the expression of certain proteins represents a safe strategy to ensure cellular survey or programmed cell death or apoptosis.

KEY WORDS: Translation, viral IRES, cellular IRES, eIFs, ITAFs.

metilada o estructura cap, que es el sitio en donde inicialmente se une el ribosoma. La región del RNA entre la estructura cap y el codón de inicio de la síntesis de proteínas (que generalmente es un AUG), se denominan región no traducida (RNT) 5'. Su longitud, composición nucleotídica y estructura, determinan la eficiencia con la cual se traduce cada RNAm. El

*Recibido: 13 de septiembre de 2005 Aceptado: 7 de febrero de 2006

Departamento de Patología Experimental. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. IPN. Av. IPN # 2508. San Pedro Zacatenco C.P. 07630 México, D. F. Teléfono 5061-3800 ext. 5677, Fax 5061-3377. Correo E: alonso@cinvestav.mx

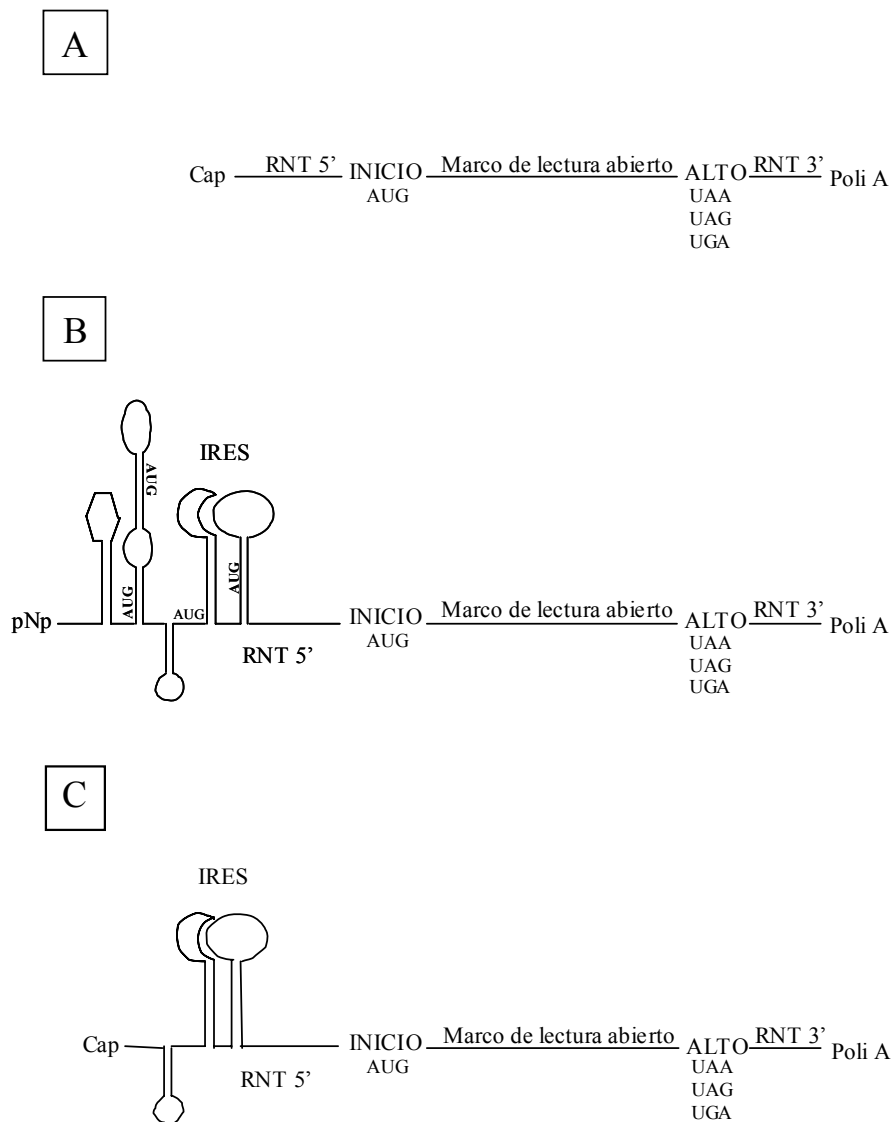


Figura 1. Representación esquemática de tres tipos diferentes de RNAm. A) RNAm eucariótico: cap o guanina metilada; RNT (región no traducida); AUG: sitio de inicio de la traducción; marco de lectura abierto o región codificante; ALTO: codón de paro; poli A: (región poliadenilada). B) RNA genómico viral con un sitio de unión interna para el ribosoma (IRES). En éste se destaca que la RNT5' es muy estructurada, contiene múltiples codones AUG antes del que es utilizado como el de inicio y es en general más larga que la de los RNA m celulares. C) RNAm celular con un IRES. La RNT 5' posee en su extremo libre a una molécula cap y posee regiones ricas en G-C.

codón AUG señala el inicio del marco de lectura abierto, que contiene la secuencia completa de la proteína que codifica, mientras que el codón de paro, que puede ser UAA, UAG o UGA señala la terminación del mismo. Enseguida se encuentra la RNT 3' seguida de una secuencia de varias veces A, conocida como cola de poli A (Fig. 1A) (1).

El inicio de la traducción es un proceso sumamente regulado, en el que además de un RNAm maduro con las señales adecuadas de inicio y las unidades funcionales de los ribosomas, se requiere de la participación ordenada de varios factores eucarióticos de inicio de la traducción o eIFs. Los eIFs son proteínas celulares que tienen la capacidad de realizar varias funciones durante la síntesis de proteínas, como

la de reconocer al cap, dirigir la unión del ribosoma al RNAm, la disociación del ribosoma del RNAm, etc. Debido a que los eIFs son los que reconocen a los RNAs maduros que pueden ser traducidos, estos pueden ser un factor limitante para el inicio de la traducción. Sin embargo, es de llamar la atención que algunos RNAm celulares y virales pueden traducirse en ambientes en los que uno o varios de estos factores canónicos se encuentran en concentraciones limitadas. En este mecanismo alternativo de inicio de la traducción, la unión del ribosoma no depende del reconocimiento del cap, sino de la unión del ribosoma a una región específica dentro de la RNT 5' denominada sitio de unión interna del ribosoma o IRES (del inglés: internal ribosome entry site). La unión del ribosoma sucede en la vecindad del codón de inicio. A este mecanismo alternativo de inicio de la traducción se le conoce como traducción dependiente de IRES.

Los IRES fueron inicialmente identificados en los genomas de algunos virus de RNA de cadena positiva, sin embargo, poco tiempo después su presencia se confirmó también en algunos RNAm celulares con características muy peculiares y con funciones críticas en la regulación de muchos procesos celulares.

INICIO DE LA TRADUCCIÓN DEPENDIENTE DE CAP

El mecanismo de inicio de la traducción dependiente de cap (guanosina trifosfato metilada), también conocido como canónico o de barrido del ribosoma (en inglés ribosome scanning) es mediante el cual se sintetizan comúnmente las proteínas celulares. La evidencia, tanto bioquímica como genética, ha demostrado que la mayoría de los RNAm eucarióticos reclutan a los ribosomas a través de la participación del complejo de unión al cap o eIF4F. Éste se encuentra for-

mado a su vez por tres factores: el eIF4E, que es el que interacciona directamente con el cap, el eIF4A, con una función de helicasa dependiente de ATP, implicada en el desenrollamiento de las estructuras secundarias del RNAm y el eIF4G, que se une al eIF4E y eIF4A y actúa como una plataforma que permite la interacción con el complejo de preiniciación constituido a su vez por el complejo ternario (eIF2-GTP- Met-tRNA), la subunidad ribosomal 40 S y el eIF3. Este último es el responsable de la interacción directa entre el complejo de preiniciación y el eIF4G (Fig. 2). Una vez que esto sucede, otros factores como eIF1A actúan sinérgicamente para permitir el avance del complejo de preiniciación en dirección 5' a 3' desde el sitio de unión inicial hasta el codón de inicio de la traducción. Este movimiento requiere de la hidrólisis de ATP. Los eIF1A, eIF2-GTP y eIF5 participan en el reconocimiento del codón de inicio, favoreciendo su apareamiento con el anticodón presente en el Met-tRNA. Posteriormente, el eIF5 induce la hidrólisis del GTP unido al eIF2 (primera hidrólisis de GTP), dando como resultado la formación de un eIF2 unido a GDP, que es inactivo hasta que es reciclado a la forma activa eIF2-GTP mediante la actividad de el eIF2B, un factor de intercambio de guaninas. Finalmente, con la energía proporcionada por la hidrólisis del GTP unido al eIF2 y con la participación del eIF5 se regula la liberación de los factores del complejo de preiniciación. Posteriormente la unión de la subunidad 60 S con la 40 S se cataliza mediante la hidrólisis del GTP unido al eIF5B (segunda hidrólisis de GTP) (2). Esta serie de eventos trae como consecuencia la formación del complejo de inicio de la traducción 80 S para permitir la síntesis de proteínas (Fig. 2).

El inicio de la traducción ocurre generalmente en el triplete AUG que se encuentra más cercano al extremo

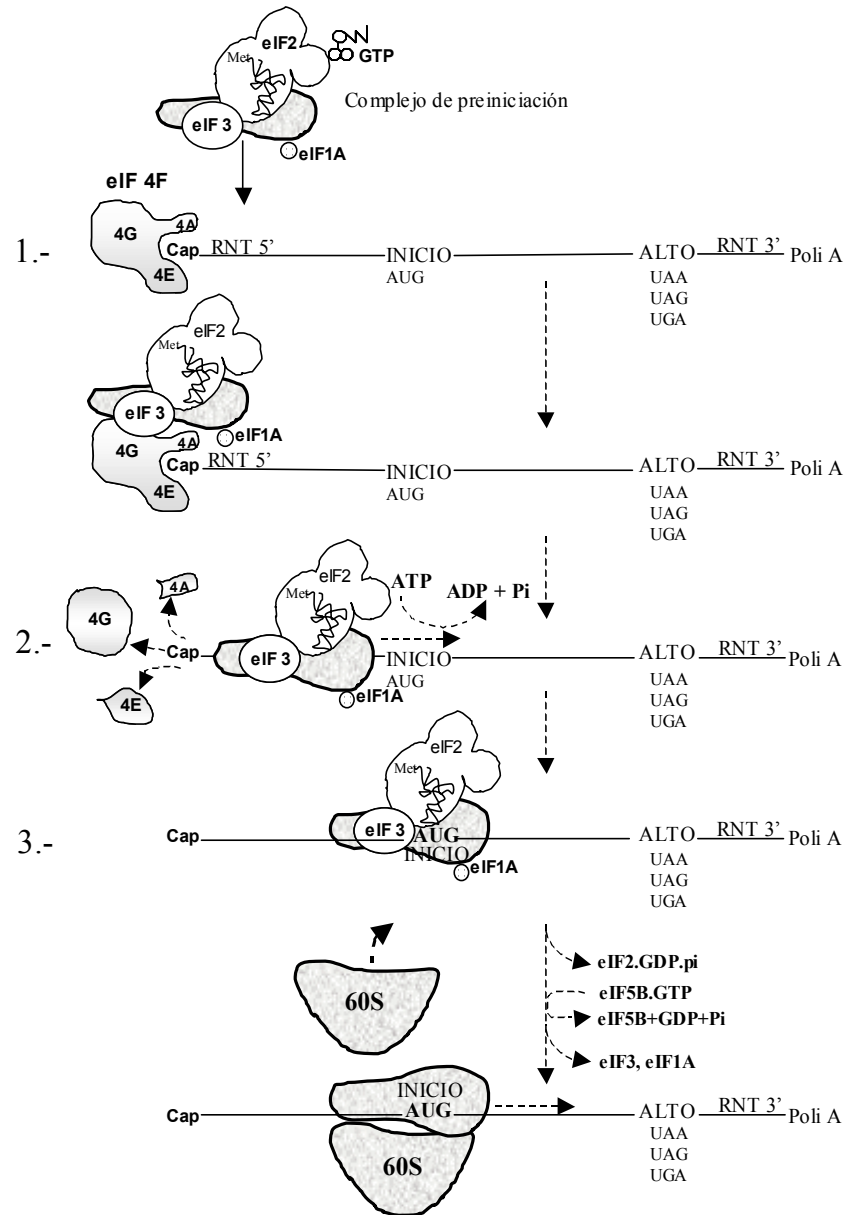


Figura 2. Representación esquemática de las condiciones de interacción y barrido del ribosoma con el RNAm durante la traducción dependiente de cap. El mecanismo de inicio de la traducción dependiente de cap postula tres pasos a través de los cuales la subunidad ribosomal 40 S alcanza al codón de inicio de la traducción: 1.- El complejo de preiniciación (subunidad ribosomal 40 S unida al eIF2-GTP-Met-tRNA y eIF3) se une al complejo de unión al cap (eIF4F) el cual está presente en el RNAm que será traducido. 2.- El complejo de preiniciación con la ayuda del eIF1A y la hidrólisis de ATP, puede avanzar sobre el RNA hasta alcanzar el codón de inicio AUG. 3.- El complejo de preiniciación reconoce al codón AUG, que en general es el primero que encuentra, los eIFs se liberan del complejo y la subunidad ribosomal 60 S se une a la 40 S para formar al complejo ribosomal 80 S. La unión de las subunidades es catalizada por el factor de iniciación eIF5B. (Modificada de la referencia 6).

5'terminal del RNAm, aunque los AUG más eficientes son aquellos que se encuentran rodeados de una secuencia en la que, siendo la adenosina del AUG el sitio +1, los nucleótidos -3 y

+4 son purinas (3). Si estos dos sitios son ocupados por pirimidinas, el ribosoma continúa el barrido hasta el siguiente AUG. Sin embargo, si durante el barrido el ribosoma se encuen-

tra con una estructura de tallo y burbuja estable, generalmente se disocia del RNA deteniéndose la síntesis de proteínas (3).

Es importante mencionar que no todas las estructuras estables en el RNA pueden tener un efecto inhibitorio de la traducción sino que por el contrario pueden favorecerla, como sucede en el inicio de la traducción dependiente de IRES.

INICIO DE LA TRADUCCIÓN DEPENDIENTE DE IRES

Hace algunos años se describió por primera vez la existencia de un mecanismo de inicio de la traducción alternativo, en el que el ribosoma interactúa con el RNA sin la participación de la estructura cap (4). Este mecanismo denominado inicialmente como independiente de cap, requiere de la presencia de un IRES y fue identificado por primera vez en la RNT 5' del RNA del virus de la polio (PV) y de la encefalomiocarditis (EMCV) (3). Esta región funciona de manera análoga al cap, ya que permite que el ribosoma se reclute para el inicio de la síntesis de proteínas. Sin embargo, a diferencia del cap, el IRES permite la unión del ribosoma en una secuencia interna del RNAm, localizada comúnmente en la RNT 5' y en algunas ocasiones dentro de los primeros nucleótidos de la región codificante y no en el extremo 5' terminal. Actualmente se han identificado elementos IRES en todos los picornavirus y en otros virus con genomas de RNA pertenecientes a otras familias, como la de los flavivirus (virus de la Hepatitis C o HCV), retrovirus, e incluso en virus de DNA como el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi. Más aún los elementos IRES también han sido identificados en las RNT 5' de un gran número de RNAm celulares, lo que apoya la idea de su relevancia en la traducción (5).

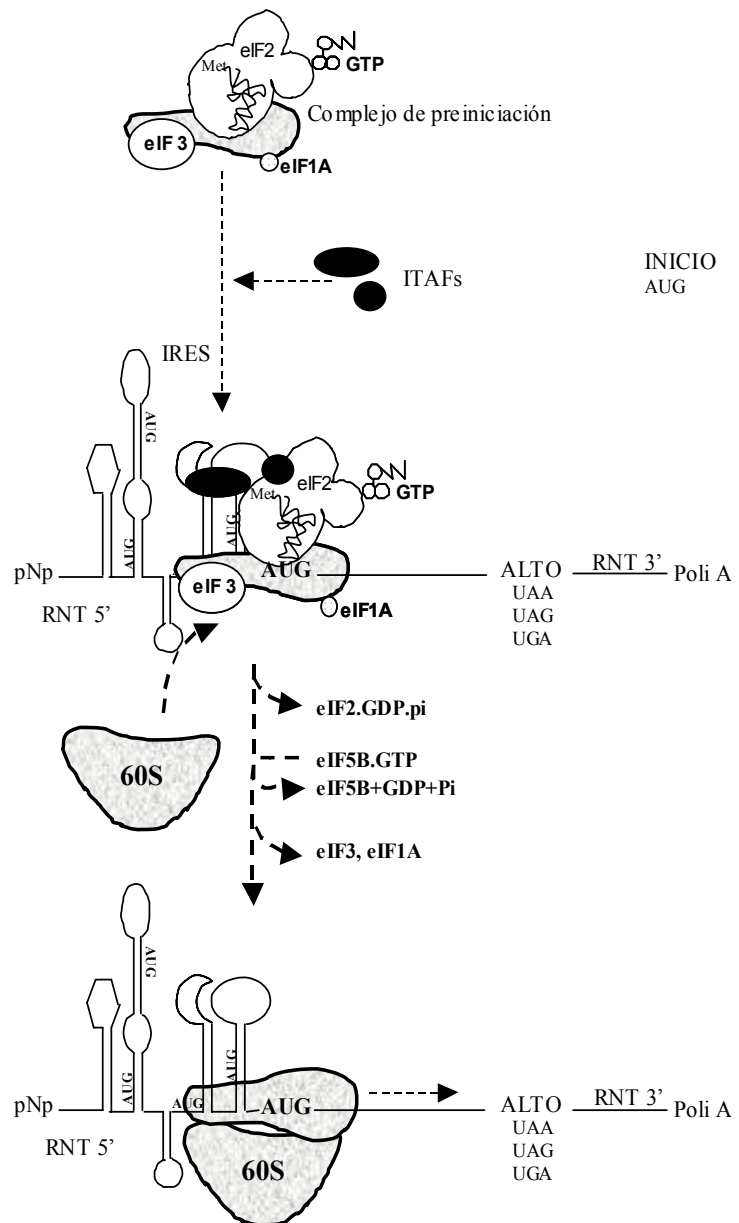


Figura 3. Representación esquemática de la interacción interna del ribosoma con el RNAm durante la traducción dependiente de IRES. Este mecanismo puede describirse en un solo paso, en el que el complejo de preiniciación alcanza la vecindad del sitio de inicio de la traducción (en algunas ocasiones requiere realizar un proceso de barrido río abajo del sitio de unión hasta alcanzar el AUG de inicio). En este tipo de traducción, los ITAFs participan junto con el IRES para permitir la interacción con el complejo de preiniciación y promover la traducción interna.

CARACTERÍSTICAS DE LOS IRES VIRALES

En términos generales los IRES presentes en los RNAm virales son regiones con una gran cantidad de estructuras secundarias y terciarias (denominadas de tallo y burbuja), localizadas en RNT 5' usualmente largas, que poseen múltiples tripletes AUG no conservados, río arriba del

codón de inicio (Fig. 1B). Tanto los elementos de tallo y burbuja como la presencia de tripletes AUG pueden ser un impedimento para el barrido del ribosoma, por lo que, durante la traducción dependiente de IRES, el ribosoma debe ser reclutado directamente a un sitio cercano al codón de inicio (Fig. 3).

Paradójicamente, la participación de los elementos estructurados es parte fundamental en la función de los IRES, ya que se ha observado que pequeñas mutaciones puntuales o eliminaciones de algunos nucleótidos en las secuencias que forman tanto a los tallos como a las burbujas traen como consecuencia una disminución drástica o incluso la inhibición de la capacidad de traducción del RNAm. En muchas ocasiones las mutaciones que se presentan en estos IRES son capaces de revertir o bien de generar mutaciones compensatorias que permiten la restauración de las estructuras secundarias y por lo tanto de la función del IRES (6).

El estudio de la actividad traduccional de los IRES de diversos virus ha permitido saber que, aunque todos ellos contienen secuencias con estructuras secundarias y terciarias específicas y en un determinado orden para promover la traducción, son pocas las similitudes que presentan tanto en secuencia como en tamaño y estructura. Las excepciones a este hecho la constituyen los IRES de virus que pertenecen a la misma familia o que se encuentran relacionados. Hasta el momento se desconocen los detalles de cómo estas estructuras pueden reclutar al ribosoma, sin embargo, es evidente que su integridad es esencial para el ensamblaje de un complejo competente de inicio de la traducción.

CARACTERÍSTICAS DE LOS IRES CELULARES

Los IRES celulares se encuentran generalmente en RNAm que codifican proteínas relacionadas con la regulación de la expresión genética, durante el desarrollo, la diferenciación, la progresión del ciclo celular, el crecimiento celular, la apoptosis, la angiogénesis y el estrés. A pesar de que su organización estructural está poco definida, se conoce que, a diferencia de los IRES virales, los celulares si poseen a la es-

tructura cap, por lo que los RNAm pueden traducirse mediante ambos mecanismos y producir una proteína idéntica. Sin embargo, cuando los IRES celulares se encuentran dentro de regiones codificantes del RNAm, se producen dos proteínas diferentes, una mediante la traducción dependiente de cap y la otra de manera dependiente de IRES. En otras ocasiones, la traducción de estos RNAm celulares puede ser mucho más compleja, y el balance entre ambos tipos de inicio de la traducción resulta en la producción de isoformas distintas de una proteína. Por ejemplo, el RNAm del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) dirige la síntesis de cinco proteínas diferentes; la de mayor peso molecular se produce exclusivamente mediante una traducción dependiente de cap, mientras que la expresión de las otras cuatro es dependiente de IRES. El uso de diferentes codones para producir las al parecer, depende de las características propias de la región que permiten su interacción con ciertos factores proteicos celulares (7).

En cuanto a la estructura y función de los IRES celulares, en muchos de ellos se han identificado regiones ricas en G-C y tienen estructuras de tallo y burbuja complejas (Fig. 1C), sin embargo, éstas no se encuentran conservadas, ni siquiera entre RNAs de familias relacionadas. Las delecciones en los IRES celulares rara vez deshabilitan el complejo de traducción, lo que implica que la relación entre la estructura y la función de estos elementos no es tan rígida como en los virus. De hecho en muchas ocasiones, secciones individuales de los IRES celulares son capaces de promover el inicio de la traducción interna aunque menos eficientemente que cuando los IRES se encuentran completos (8). Esto ha permitido proponer la hipótesis de que muchos de los IRES celulares se encuentran compuestos de pequeños módulos y que

la combinación de ellos es lo que determina la eficiencia del inicio de la traducción interna.

FACTORES CELULARES IMPLICADOS EN LA TRADUCCIÓN DEPENDIENTE DE IRES

Para que un IRES sea funcional, se requiere que interactúe con proteínas celulares específicas, las cuales participan activamente en favorecer la unión del ribosoma y el inicio de la síntesis de proteínas. Es posible que el papel de estas proteínas sea el de causar un cambio en la conformación de las estructuras de tallo y burbuja presentes en los RNAm.

eIFs

Los primeros estudios en los que se identificaron proteínas celulares que interactuaban con los IRES no involucraban a los eIFs, por lo que se pensó que su participación funcional debía ser relativamente pobre. Esta idea se basaba en el hecho de que la traducción dependiente de IRES es capaz de operar en ambientes en los que algunos eIFs se encuentran modificados de tal forma, que no pueden participar en la traducción dependiente de cap, como cuando se encuentran fosforilados, defosforilados o procesados proteolíticamente. Estas situaciones se presentan durante la infección con algunos virus, en condiciones de estrés celular (como la falta de nutrientes, choque térmico, etc.), en ciertas fases del ciclo celular y cuando la célula se encuentra en apoptosis (9, 10).

Sin embargo, en los últimos años se determinó que al igual que en la traducción dependiente de cap, los eIFs tienen papeles esenciales en el inicio de la traducción dependiente de IRES virales (11). Por ejemplo, los factores eIF4G, eIF4A, eIF2 y eIF3 son indispensables para la formación del complejo que participa en la traducción dependiente de IRES del EMCV y del

TABLA 1

**Interacciones funcionales entre elementos IRES
y factores proteicos**

IRES virales	Factores de inicio de la traducción o eIFs	Factores de actividad en trans o ITAFs
Virus de la encefalo-miocarditis	eIF4G-Ct, eIF4A, eIF3, eIF2	PTB
Virus de la fiebre aftosa	eIF4G-Ct, eIF4A, eIF3, eIF2	PTB, ITAF 45
Poliovirus	No conocidos	PTB, PCBP-2, La, unr
Rinovirus	No conocidos	PTB, PCBP-2, La, unr
Virus de la hepatitis C	eIF3 (solo para el ensamblaje del ribosoma 80S)	PTB, PCBP-2, La
Virus de la parálisis de grillos	Ninguno	No conocidos
IRES Celulares		
Bip	No conocido	PTB
Apaf-1	No conocido	unr y PTB
c-myc	No conocido	PCBP

Bip: Prot. de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina; Apaf-1: Factor 1 activador de la proteasa apoptótica (11 y 12).

virus de la fiebre aftosa (FMDV) (Tabla 1). Más aún, la región carboxilo terminal del factor eIF4G, que es procesada proteolíticamente durante la infección por estos virus, participa en posicionar al ribosoma en el IRES tan eficientemente como lo hace la proteína intacta (9). La participación de los eIFs en la traducción dependiente de IRES en los RNAm celulares no ha sido documentada hasta la fecha.

ITAFs

Por otro lado, se ha descrito la participación de proteínas celulares que actúan en trans (ITAFs, del inglés IRES trans-acting factors) para regular la traducción dependiente de IRES tanto en RNAm virales como celulares (Tabla 1) (12, 13). Entre ellos se

han identificado a las proteínas celulares La, PTB, PCBP, hnRNP-C, hnRNP-L, nucleolina, unr, etc., que paradójicamente en la mayoría de los casos tienen localización nuclear. Es probable que estas proteínas, después de ser traducidas y antes de ser transportadas al núcleo, estén accesibles para ser utilizadas en la traducción dependiente de IRES. Sin embargo, se sabe que tras la infección viral, algunos ITAFs, como por ejemplo La, PTB y nucleolina, son relocados del núcleo al citoplasma mediante diversas estrategias, lo que asegura su presencia en el sitio donde la traducción dependiente de IRES se lleva a cabo. Tanto la afinidad de los ITAFs por determinados IRES como la función que desempeñan es sumamente varia-

ble aunque generalmente indispensable (11). Los ITAFs pueden actuar de diferentes maneras: aumentando o disminuyendo la traducción de los RNAs virales y/o celulares (14, 15), como chaperonas, favoreciendo diferentes conformaciones en los IRES que permiten el acoplamiento del complejo ribosomal y el inicio de la síntesis de proteínas, o inclusive participar en el reconocimiento del AUG de inicio correcto (16).

Una excepción a la participación de los ITAFs lo constituye el IRES del virus de la parálisis de los grillos (CrPV) que puede regular el inicio de la traducción sin la participación de factores proteicos. Este IRES adquiere una estructura secundaria que sustituye el papel funcional del Met-tRNA y es capaz de reclutar a la subunidad ribosomal 40 S por si mismo (17).

A medida que se identifican nuevos IRES, se conoce un espectro mayor de factores, estructuras y nuevos elementos que participan en este mecanismo alterno de la traducción.

Los IRES, presentan una gran diversidad en relación a su secuencia, tamaño, estructura primaria y presencia de elementos de tallo y burbuja. Si a ello añadimos la variedad tan grande de proteínas que interactúan con ellos, podríamos sugerir que seguramente aparecieron en diferentes puntos de la evolución. Es probable que la selección de los IRES, dependa de su habilidad para interactuar con factores esenciales en el reclutamiento de las unidades ribosomales. La relación filogenética entre los IRES celulares y virales todavía es desconocida.

SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LOS IRES EN LOS VIRUS

El inicio de la traducción dependiente de IRES constituye una estrategia que algunos virus han desarrollado para poder multiplicarse eficientemente en una célula en donde inhiben la traducción celular para favorecer la expre-

sión de sus propios genes. Por ejemplo, tras la infección con algunos picornavirus se induce el procesamiento del factor eIF4G y la inhibición de la fosforilación de un factor de unión al eIF4E, el eIF4E-BP1, situaciones que impiden que el eIF4G se una al RNAm y por lo tanto que la traducción dependiente de cap proceda. Sin embargo los elementos celulares involucrados en la traducción dependiente de IRES no se modifican. Esto permite que la síntesis de proteínas virales ocurra sin que tengan que competir con los RNAm celulares por la maquinaria traduccional.

La infección por algunos picornavirus no solo inhibe la traducción celular sino que favorece el funcionamiento de sus IRES ya que induce la reubicación de los ITAFs del núcleo hacia el citoplasma, haciéndolos disponibles para su uso en la traducción dependiente de IRES.

Ambas situaciones son algunos ejemplos de lo que los virus son capaces de modificar en el micro ambiente celular para favorecer su propia traducción.

EN LOS RNAm CELULARES

A diferencia de lo que ocurre tras una infección viral, los RNAm celulares con IRES no inducen la inhibición de la traducción dependiente de cap, sino que por el contrario son activados únicamente cuando esta condición se presenta previamente en la célula, como sucede en estados de estrés, como tras algunas infecciones virales, la falta de factores de crecimiento y nutrientes (estrés celular), el choque térmico, la radiación con luz ultravioleta, la hipoxia, e inclusive durante la mitosis y la diferenciación celular. En estas condiciones la síntesis de proteínas se inhibe muy rápidamente como resultado de modificaciones en los componentes de la maquinaria traduccional, como fosforilación y proteólisis de eIFs. Por ejemplo, cuan-

do el eIF2-GTP es fosforilado, este factor es activo e inclusive el GTP puede hidrolizarse, sin embargo, el eIF2-GDP fosforilado, no puede ser reciclado nuevamente a la forma activa eIF2-GTP y por lo tanto la tasa global de síntesis de proteínas dependiente de cap es inhibida. Sorprendentemente bajo estas condiciones, un gran número de RNAm que contienen IRES como el factor de crecimiento derivado de plaquetas-2, el factor de crecimiento vascular endotelial, el oncogene c-myc y la cinasa PITSLRE continúan traduciéndose en estas condiciones. Más aún, algunos de estos RNAs con IRES requieren de la fosforilación previa de eIF2 para poder traducirse (7).

Por otro lado, la inhibición de la síntesis de proteínas durante la apoptosis es debida principalmente al procesamiento proteolítico de los factores eIF4G, eIF4B, eIF2 y eIF3 por algunas caspasas. Bajo estas condiciones, algunos genes como el c-myc, la chaperona HSP70, las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, la proteína cinasa C delta y el factor activador de la proteasa de apoptosis (APAF-1) pueden traducirse debido a la presencia de elementos IRES, que posiblemente, no dependen de los eIFs íntegros o que son independientes de algunos de ellos.

En términos generales, la traducción dependiente de IRES en los RNAm celulares puede considerarse como un mecanismo de protección que representa una estrategia a prueba de fallas para asegurar la síntesis de ciertas proteínas que pueden ayudar a las células a lidiar con condiciones de estrés transitorio hasta su recuperación. Sin embargo, en condiciones más severas de estrés, los IRES que se activan son los que están presentes en los RNAm que codifican proteínas que regulan las vías pre-apoptóticas. Es por ello que la regulación de la traducción mediante los elementos IRES

puede constituir una pieza clave tanto en la sobrevivencia como en la muerte celular programada, lo que pone de manifiesto la importancia biológica de este mecanismo alterno de síntesis de proteínas.

El mecanismo de traducción dependiente de cap es un claro ejemplo de la actividad catalítica del RNA durante la síntesis de proteínas, ya que el RNAm se puede autoprocesar durante su maduración, el ribosomal (23S rRNA) actúa como catalizador para acoplar los aminoácidos durante la síntesis de proteínas y el de transferencia es capaz de acoplar al RNAm con el ribosoma. Podría considerarse entonces que en la traducción dependiente de IRES, esta región actúa como un elemento catalítico adicional y selectivo para la síntesis de proteínas en condiciones adversas.

APLICACIONES DE LOS IRES

Muchos de los RNAm celulares que tienen IRES, codifican proteínas cuya expresión está finamente regulada, por lo que modificaciones mínimas en estas regiones pueden generar cambios en su nivel de expresión, produciendo efectos fisiológicos y consecuencias patológicas dramáticas, como en los procesos implicados en desordenes degenerativos o en neoplasias. Es por ello que el conocimiento de las estrategias que controlan la actividad de los IRES puede permitir usarlos con fines terapéuticos.

Asimismo, los IRES pueden ser utilizados como herramientas biotecnológicas para la síntesis de varias proteínas de interés a partir de un único RNAm, pero multicistónico. Esto es, que contenga varias secuencias que codifiquen diferentes proteínas, separadas entre si por elementos IRES, cada uno de los cuales actuaría como un promotor interno, favoreciendo la traducción de todas las proteínas codificadas en ese RNAm.

REFERENCIAS

1. Hershey JWB, Merrick WC (2000) The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. En: Translational control of gene expression (ed. N. Sonenberg et al), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 33-88.
2. Lee JH, Pestova TV, Shin BS, Sang CC, Choi K, Dever TE (2002) Initiation factor eIF5B catalyzes second GTP-dependent step in eukaryotic translation initiation. PNAS 99:16689-94.
3. Kozak M (1989) The scanning model for translation: an update. J Cell Biol 108:229-41.
4. Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature 334:320-25.
5. Macejak DG, Sarnow P (1991) Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. Nature 353:90-94.
6. Trono D, Andino R, Baltimore D (1988) An RNA sequence of hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis. J Virol 62:2291-99.
7. Komar AA, Hatzoglou M (2005) Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. J Biol Chem 280:23425-28.
8. Jopling CL, Springs KA, Mitchel SA, Stonoley M, Willis AE (2004) L-Myc protein synthesis is initiated by internal ribosome entry. RNA 10:287-98.
9. López de Quinto S, Martínez-Salas E (2000) Interaction of eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. RNA 6:1380-92.
10. Marrison WE, Gradi A, Sonenberg N, Lloyd RE (2000) Cleavage of eucaryotic translation factor 4GII correlates with translation inhibition during apoptosis. Cell Death Diff 7:1234-43.
11. Martínez-Salas E, Ramos R, Lafuente E, López de Quinto S (2001) Functional interactions in internal translation initiation detected by viral and cellular IRES elements. J Gen Virol 82:973-84.
12. Stoneley M, Wills A E (2004) Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. Oncogene 23:3200-07.
13. Hellen C, Sarnow P (2001) Internal ribosome entry sites in eucariotic mRNA molecules. Genes and Develop 15:1593-1612.
14. Domitrovich AM, Diebel KW, Ali N, Sarker S, Siddiqui A (2005) Role of La autoantigen and polypirimidine tract-binding protein in HCV replication. Virology 335:72-86.
15. Meerovitch K, Svitkin YV, Lee HS, Lejbkowiez F, Kenan DL, Chan EK, Agol VI, Keene JD, Sonenberg N (1993) La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. J Virol 67:3798-3807.
16. Sarnow P (2003) Viral internal ribosome entry site elements: novel ribosome-RNA complexes and roles in viral pathogenesis. J Virol 77:2801-06.
17. Jan E, Sarnow P (2002) Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. J Mol Biol 324:889-902.

CANALES MITOCONDRIALES DE POTASIO SENSIBLES A ATP Y CARDIOPROTECCIÓN*

Gerardo de Jesús García-Rivas

RESUMEN

Una de las estrategias más efectivas para proteger al corazón del daño por reperfusión es someterlo a uno o varios períodos cortos de isquemia antes de una isquemia prolongada y severa, que pueda conducir al daño miocárdico y a la muerte celular. Esta estrategia conocida como preconditionamiento isquémico (PCI) se basa en la activación de diversos mecanismos cuya importancia se encuentra actualmente bajo discusión. Se ha sugerido que los canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP, participan en la protección derivada del PCI. En esta revisión se presenta información reciente que sustenta esta hipótesis y enfatiza la modulación farmacológica de este tipo de canales.

PALABRAS CLAVE: Cardioprotección, canales mitocondriales de potasio, diazóxido, daño por reperfusión.

ABSTRACT

Ischemic preconditioning (IPC) is an effective strategy for reducing heart damage triggered by ischemia reperfusion. IPC consists of exposing heart to a single or multiple brief periods of ischemia before the occurrence of a more prolonged ischemic insult, which otherwise would lead to massive myocardial damage and cell death. Comprehensive data suggest the participation of ATP-sensitive potassium channels in IPC protection. Although these type of channels are present in both the sarcolemmal and the inner mitochondrial membrane of heart cells, the evidence reviewed here suggest that the mitochondrial channels and not the sarcolemma channels, contribute to the cardioprotection. The pharmacological modulation of these channels is emphasized.

KEY WORDS: Cardioprotection, mitochondrial potassium channels, diazoxide, reperfusion injury.

INTRODUCCIÓN

Nuestro conocimiento de la fisiología de los canales iónicos ha aumentado enormemente durante los últimos 20 años, debido a los avances en las técnicas de medición de canal único y de clonación molecular. Hasta el momento más de 50 diversos canales de potasio se han identificado y de acuerdo a sus características estructurales, se han clasificado en al menos dos grandes grupos. Los canales formados por proteínas con seis dominios transmembranales, que incluyen a los dependientes de voltaje (K_v) y a los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) y los canales formados por 2

dominios transmembranales, que agrupa a los rectificadores entrantes (K_{ir}), a los acoplados a proteínas G y a los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) (1). Este último tipo de canales se identificó hace veintidós años, por Akinori Noma en parches de membrana plasmática de cardiomiocitos ventriculares. Posteriormente fueron encontrados en otros tejidos incluyendo el cerebro, el músculo liso y esquelético, el endotelio y el páncreas, órgano en donde se les ha relacionado con la secreción de la insulina. Ya que estos canales se activan al disminuir la concentración de ATP intracelular y acoplan el metabolismo miocárdico

con la actividad eléctrica, se propuso que durante la hipoxia estos canales podrían servir como un mecanismo endógeno de cardioprotección, al acortar la duración del potencial de acción y limitar la entrada de calcio a las células cardíacas (2). Hasta 1994 se asumía que éste era el mecanismo de acción del preconditionamiento isquémico (PCI) y que el efecto protector de los agonistas de los canales de K_{ATP} contra el daño por reperfusión se debía a su acción sobre dichos canales. Sin embargo, a partir del trabajo de Yao y Gross se acumularon evidencias de que el efecto protector no siempre corre-

*Recibido: 13 de septiembre de 2005 Aceptado: 7 de febrero de 2006

Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Juan Badiano 1. Sección XVI, C.P. 14080 México D.F. Teléfono 5573-2911 ext. 1465. Fax 5573-0926. Correo E. ailthamones@yahoo.com

lacionaba con la reducción del potencial de acción, situación que implicaba la existencia de sitios adicionales, posiblemente intracelulares, para explicar el efecto protector de estos agonistas (3).

Los canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP ($mitK_{ATP}$), se describieron por primera vez por Inoue y colaboradores en 1991 en mitoplastos gigantes preparados a partir de mitocondrias de hígado de rata (4). Este grupo reportó que la conductancia de estos canales (alrededor de 10 pS en 100 mM de potasio en la matriz y 33 mM en el citosol), era inactivada reversiblemente por ATP y además compartían antagonistas con los canales de membrana plasmática. Un año más tarde, Paucke en el laboratorio de Keith Garlid, aisló y purificó parcialmente un canal $mitK_{ATP}$ de mitocondrias de corazón de res y demostró que estos canales tenían características similares a los de la membrana plasmática. Sin embargo, observó que su función estaba relacionada principalmente con el control del volumen de la matriz mitocondrial y no con la regulación de la actividad eléctrica como se había descrito para los canales de K_{ATP} de la membrana plasmática (5). Al estudiar el efecto de los inhibidores y activadores de estos canales sobre algunas funciones mitocondriales, se dio la pauta para establecer una estrecha relación entre los canales $mitK_{ATP}$ y la cardioprotección, lográndose explicar la paradójica observación, de que algunos activadores de canales de K_{ATP} protegían durante la reperfusión post-isquémica, sin alterar la actividad de los canales de K_{ATP} en la membrana plasmática.

CANALES $mitK_{ATP}$ y CARDIO-PROTECCIÓN

La adaptación del corazón a la hipoxia crónica como estrategia de cardioprotección, resultó de una serie de estu-

dios epidemiológicos a finales de los cincuenta que mostraban una disminución significativa en la incidencia de infartos miocárdicos en personas que vivían a gran altura. Estas observaciones fueron confirmadas en estudios experimentales, usando una cámara hipobárica, mostrando que dicha condición limitaba el tamaño del infarto miocárdico (6). Después de un gran periodo de escepticismo, Charles Murry en el laboratorio de Robert Jennings encontró que 4 ciclos breves de oclusión coronaria antes de una oclusión de 40 minutos, reducían el infarto en un 75% (7). A partir de estos hallazgos, este fenómeno fue llamado PCI y se convirtió en una de las estrategias más efectivas para proteger al corazón del daño por reperfusión. Los mecanismos de cardioprotección generados por el PCI, se encuentran aún bajo discusión; sin embargo, diversos estudios sugieren que los canales K_{ATP} pudieran estar involucrados, pues se ha determinado que durante los ciclos breves de hipoxia estos canales se activan. Adicionalmente el tratamiento con activadores de estos canales reproducen el efecto protector del PCI, mientras que los bloqueadores de los mismos evitan la protección del PCI.

En 1997 el grupo de Garlid presentó el primer trabajo en el que se mostraba evidencia directa de la relación entre los canales $mitK_{ATP}$ y la cardioprotección. Este grupo de investigadores reportó que la farmacología de los canales de K_{ATP} de la membrana plasmática y la de los canales $mitK_{ATP}$ era sorprendentemente diferente al analizar el efecto protector contra el daño por reperfusión de la sulfonamida diazóxido. Este compuesto demostró tener una potencia 2000 veces más alta sobre los canales mitocondriales ($K_{0.5} = 0.4 \mu M$) que sobre los de sarcolema ($855 \mu M$). El espectacular efecto protector del diazóxido fue bloqueado por la

glibenclamida y otros antagonistas de los canales de K_{ATP} . Estos resultados sugerían que el diazóxido y otros abridores de canales de K_{ATP} interactúan con los canales de la mitocondria para producir el efecto cardioprotector (8). En concordancia con los resultados de Garlid y colaboradores, estudios en el laboratorio de Eduardo Marbán han demostrado que el diazóxido es un abridor selectivo de canales $mitK_{ATP}$ y que el 5-hidroxidecanoato (5-HD), es un bloqueador también muy específico para estos canales y capaz de suprimir el efecto protector del PCI (9).

Adicionalmente se ha sugerido que los canales K_{ATP} del sarcolema no están involucrados en el mecanismo del PCI, ya que novedosos y selectivos bloqueadores de los canales K_{ATP} de la membrana plasmática como el HMR1883, no inhiben el PCI como lo hace el 5-HD (10).

FARMACOLOGÍA DE LOS CANALES $mitK_{ATP}$

La naturaleza anfipática de los abridores y bloqueadores de los canales K_{ATP} , hace que interactúen con diversos blancos intracelulares generando efectos inespecíficos que compliquen la interpretación de los resultados. En la tabla 1, se resume la selectividad de diferentes agonistas y antagonistas sobre canales sarcolemales o mitocondriales. De acuerdo con los hallazgos encontrados en cardiomiocitos y en mitocondrias aisladas, los compuestos más selectivos para los $mitK_{ATP}$ son el diazóxido, el nicoradil y el BMS-191095 que tienen una actividad muy baja sobre los canales de sarcolema. Existe un grupo de abridores de canales de K_{ATP} (e.g. cromacalim, levocromacalim, EMD60480, EMD 57970, pinacidil, el sulfato de minoxidil y el KRN2391) que producen efectos en el rango submicromolar pero que no pueden discriminar entre los dos tipos de canales. En cuanto a

TABLA 1

Efecto diferencial de los abridores y los bloqueadores de los canales de K_{ATP} sobre los canales de mitocondria ($mitK_{ATP}$) y los de sarcolema (K_{ATP})		
	$mitK_{ATP}$	K_{ATP}
Abridores de canales de K		
Diazóxido	✓	a
Nicoradil	✓	b
BMS-180448	✓	×
BMS-191095	✓	×
Cromacalima	✓	✓
EMD60480, EMD57970	✓	✓
Pinacidil	✓	✓
KRN2391	✓	✓
Sulfato de minoxidil	✓	✓
Sildenafil	✓	✓
Isoflurano	✓	✓
Apricalima	✓	✓
MCC-134	×	✓
Levosimendan	✓	✓
Bloqueadores de canales de K		
5-Hidroxicanoato (5-HD)	✓	c
MCC-134	✓	×
Glibenclamida, glipizida, glisoxepida	✓	✓
Glimepirida	d	✓
HMR1098 (1883)	e	✓

Los abridores de canales, diazóxido, BMS191095, BMS-180448 y los inhibidores 5-HD y MCC-134 han mostrado selectividad sobre la forma mitocondrial, mientras que la glimepirida y el HMR-1883 son más selectivos para los canales de membrana plasmática. (✓) Significa que el abridor o bloqueador muestra actividad sobre la proteína; (×) que el compuesto no mostró ningún efecto. En algunos casos, la selectividad depende del tipo de célula y de las condiciones experimentales. **a.** El diazóxido puede activar los canales K_{ATP} a altas concentraciones o cuando la concentración de ADP es alta; **b.** El nicoradil activa los canales K_{ATP} a altas concentraciones; **c.** El 5-HD inhibe los canales K_{ATP} a bajo pH; **d.** La glimepirida inhibe los canales K_{ATP} , pero no inhibe la cardioprotección; **e.** HMR-1883 bloquea los canales K_{ATP} , pero no inhibe el PCI. (Modificado de O'Rourke B (2004) Circ. Res 94:420-432).

los bloqueadores, la glibenclamida actúa sobre ambos y el HMR1098 ha mostrado ser un bloqueador que preferentemente inhibe los canales en la membrana plasmática. En contraparte, el 5-HD inhibe selectivamente los canales mitocondriales con efectos mínimos sobre los canales K_{ATP} del sarcolema. Sin embargo, las condiciones experimentales en las que se realizó esta caracterización, parecen ser importantes en la selectividad de estos compuestos. Por ejemplo, el diazóxido no es muy potente en los canales K_{ATP} en el sarcolema de cé-

lulas cardiacas; sin embargo, es un activador muy eficiente sobre las isoformas de los canales de K_{ATP} de células pancreáticas y de músculo liso. Por ello los posibles efectos de estos compuestos sobre la disminución del infarto miocárdico podrían ir más allá de los blancos no mitocondriales en otros órganos y sistemas.

Complicando aún más este panorama, la selectividad de estas drogas puede alterarse por condiciones patológicas. Por ejemplo, durante la isquemia como resultado de cambios

en la concentración de los fosfatos de alta energía o por cambios en el pH, la sensibilidad a abridores de canales K_{ATP} parece aumentar. Otro hallazgo sorprendente es que el bloqueador 5-HD en esas condiciones, i.e. $[ADP]=1\text{mM}$ a pH 6.6, puede activar los canales $mitK_{ATP}$ (11).

Para establecer el potencial terapéutico de estos fármacos debe examinarse la selectividad de estos canales en condiciones fisiológicas, así como en condiciones de inhibición metabólica durante la isquemia para evaluar su participación en el efecto protector.

MECANISMO DE CARDIOPROTECCIÓN

Desde 1998 se han planteado diversas hipótesis sobre el posible mecanismo de protección de los canales $mitK_{ATP}$. Dichas hipótesis no son excluyentes unas con otras ya que es probable que todas contribuyan a la preservación de la función mitocondrial y contráctil en el corazón. Existe evidencia experimental que fortalece la posibilidad de que los canales $mitK_{ATP}$ disminuyan la sobrecarga de calcio mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), fenómenos que llevan al daño miocárdico y cuya relación con los canales $mitK_{ATP}$ se revisa a continuación.

A) Disminución de la sobrecarga de calcio

Durante la reperfusión la producción de ERO en la mitocondria induce la lipoperoxidación de membranas provocando un aumento en la concentración de calcio intracelular, debido principalmente a su liberación de receptáculos endógenos como el retículo sarcoplásmico. El aumento en el calcio intracelular tiene como consecuencia la acumulación de calcio en la matriz mitocondrial. Este aumento

de calcio en la mitocondria genera un ciclo fútil de liberación-recaptura en el que se pierde energía, pues la entrada de calcio en la mitocondria es dependiente de un gradiente eléctrico transmembranal negativo en el interior. Lui y colaboradores sugirieron en 1997 que los abridores de $mitK_{ATP}$ podrían disminuir la acumulación de calcio mitocondrial durante la reperfusión (12); esta hipótesis fue confirmada el siguiente año por el grupo de Terzic (13) que determinó que el diazóxido y el pinacidil disminuyen la velocidad de entrada de calcio a las mitocondrias aisladas y que este efecto es inhibido por 5-HD, este fenómeno se atribuyó a la despolarización parcial (10-25mV) del gradiente eléctrico transmembranal que ocurre como respuesta a los abridores de canales $mitK_{ATP}$. Este mecanismo se ha estudiado recientemente por nuestro grupo, utilizando inhibidores específicos del transporte de calcio mitocondrial. Nuestros resultados muestran que la disminución en la velocidad de entrada de calcio a la mitocondria está asociada a un impresionante efecto protector contra el daño por reperfusión (14).

B) Aumento/disminución en la producción de ERO

Las ERO tienen un papel esencial y a la vez contradictorio en el PCI y en la protección mediada por los abridores de los canales $mitK_{ATP}$. Al parecer la protección a través del PCI está mediada por la generación de ERO, por medio de vías activadas por radicales libres que regulan principalmente a la proteína cinasa C (PKC) por medio de un mecanismo aún no determinado (15). Adicionalmente diversos grupos han reportado que la protección por abridores de canales de K_{ATP} es inhibida por atrapadores de radicales libres. En contraposición, se ha demostrado que las ERO producen un

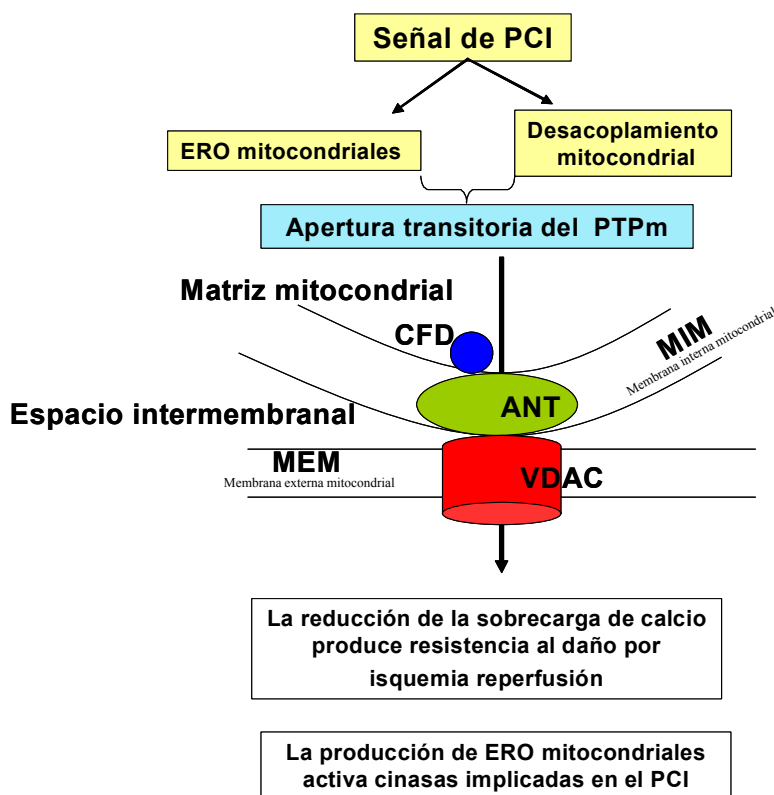


Figura 1. Esquema hipotético en el que un estado transitorio de baja conductancia del PTPm, puede producir PCI. La estructura del PTPm incluye al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el translocador de adenín nucleótidos (ANT) y la ciclofilina D (CFD). El PCI y los abridores de canales $mitK_{ATP}$ producen una apertura transitoria del PTPm, que protege al corazón por medio de la reducción de la sobrecarga de calcio mitocondrial y facilita la señalización del PCI a través de las ERO (modificado de la referencia 18).

daño irreversible a las células cardíacas durante la reperfusión y se ha obtenido evidencia experimental que apoya la hipótesis de que el PCI disminuye la producción de ERO en la mitocondria (16). La contradicción entre los resultados obtenidos por diferentes grupos hace necesario obtener pruebas adicionales que puedan aclarar la participación de este mecanismo en el PCI.

C) Apertura del PTPm

La transición de la permeabilidad mitocondrial es reconocida recientemente como una de las vías centrales de diversos procesos fisiopatológicos. El poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), es un megacanal de gran conductancia (~120 pS) que tiene múltiples estados de subconductancia y un diáme-

tro de poro de ~2nm (17). La apertura del PTPm se favorece bajo diversas condiciones pero principalmente debido a la acumulación de calcio en la matriz mitocondrial, acompañada de la disminución en la relación ATP/ADP y a un aumento en la producción de ERO. La apertura irreversible del PTPm durante la reperfusión transforma a la mitocondria, de principal productor de ATP a consumidor, acelerando la debacle energética y promoviendo la muerte celular. Adicionalmente, la apertura del PTPm provoca hinchamiento mitocondrial que causa la ruptura de la membrana interna y libera moléculas pro-apoptóticas que se encuentran en el espacio intermembranal, i.e. citocromo c, Smac/DIABLO y Endo G que promuevan la muerte celular a través de un mecanismo dependiente de caspasas. La inhibición

de la apertura del PTPm por bloqueadores específicos y por el PCI, constituye un paradigma en cardioprotección. Sin embargo, muy recientemente se ha demostrado que un estado transitorio de baja conductancia de este poro es un prerrequisito para que el PCI y los abridores de los mitK_{ATP} puedan ejercer su efecto protector. Esta conductancia transitoria puede limitar la acumulación de calcio en la matriz, favoreciendo la salida de calcio y generando las ERO, que activan proteínas cinasas implicadas en el mecanismo de protección del PCI (18). Una representación esquemática del papel de esta apertura transitoria del PTPm se presenta en la figura 1.

ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CANALES mitK_{ATP}

La estructura de la proteína formadora del canal en la mitocondria es muy controversial y hasta el momento no se han obtenido resultados definitivos. En general, la actividad de entrada de potasio se ha observado en liposomas reconstituidos con proteínas mitocondriales con pesos entre 50 y 60 KDa. En estos proteoliposomas se ha identificado una proteína de 54 KDa que podría ser un componente de los canales mitK_{ATP} (5). Adicionalmente, se ha sugerido que los canales mitK_{ATP} pueden estar constituidos por subunidades de canales rectificadores entrantes (Kir) en asociación con un receptor de sulfonilurea (SUR). Esta hipótesis está sustentada por experimentos en los que anticuerpos contra Kir6.1 reconocen a una proteína de 51 KDa en preparaciones mitocondriales de la membrana interna (19). En contraposición, la protección del PCI en corazones de ratones "knockout" para Kir6.1 y Kir6.2 se mantuvo intacta sugiriendo que estas subunidades no forman parte de los canales mitK_{ATP}

(20). La posibilidad de que un SUR pueda constituir este canal se sostiene con base en diversos reportes que muestran que las membranas mitocondriales presentan sitios de baja unión a sulfonilurea y por la presencia de una proteína de 63 KDa con esas características de unión (21). Recientemente, el grupo de Eduardo Marbán en Baltimore describió que la enzima del ciclo de Krebs succinato deshidrogenasa (SDH), que se encuentra formando supercomplejos macromoleculares en la membrana interna mitocondrial al ser purificada y reconstituida en liposomas o en bicapas lipidicas, mostró actividad semejante a los canales mitK_{ATP} . Esta actividad no solo es sensible a ligandos de los canales mitK_{ATP} sino también a inhibidores de la SDH. Usando la técnica de co-inmunoprecipitación, este grupo identificó al menos cuatro proteínas que interactúan físicamente con la SDH: la proteína mABC1 (por su nombre en inglés ATP-binding cassette protein 1), el ANT (translocador de adenín nucleótidos), la ATP sintetasa y el acarreador de fosfatos. Una fracción que contenía este supercomplejo

fue incorporada en liposomas y mostró actividad semejante a los canales mitK_{ATP} sensible a 5-HD. Estos datos sugieren que el complejo formado, al menos, por estas cinco proteínas de la membrana interna mitocondrial es el componente estructural y funcional de los canales mitK_{ATP} (22) (Fig. 2).

CONCLUSIONES

El potencial farmacológico y terapéutico de los canales K_{ATP} resulta de mucho interés para el tratamiento de las patologías asociadas al daño por isquemia-reperfusión en el corazón. Sin embargo, falta comprender con mayor detalle los mecanismos que producen su efecto protector durante la perfusión miocárdica. La participación de los canales mitocondriales en el mecanismo protector, esta apoyada por mucha evidencia farmacológica. Sin embargo, es indispensable la purificación y la caracterización de estos canales, para contribuir al desarrollo de fármacos más selectivos para un posible tratamiento clínico, ya que la mayoría de los abridores de los canales K_{ATP} tienen poca selectividad tisular y por ello su uso en la clínica es limitado.

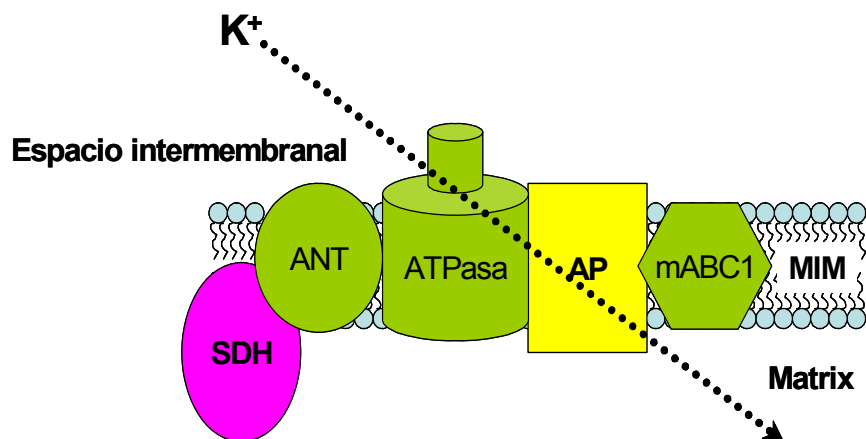


Figura 2. Representación esquemática del supercomplejo mitocondrial que presenta actividad de canal mitK_{ATP} . El complejo contiene al menos cinco proteínas: la proteína mABC1 (por su nombre en inglés ATP-binding cassette protein 1), el translocador de adenín nucleótidos (ANT), la ATP sintetasa (ATPasa), el acarreador de fosfatos (AP) y la succinato deshidrogenasa (SDH). La subunidad formadora del poro del canal no ha sido aún caracterizada.

REFERENCIAS

1. Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kupersmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS (2003) International Union of Pharmacology XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55:583-6.
2. Noma A (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305:147-8.
3. Yao Z, Gross GJ (1994) Effects of the K_{ATP} channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation* 89:1769-75.
4. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352:244-7.
5. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267:26062-9.
6. Poupa O, Krofta K, Prochazka J, Turek Z (1966) Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc* 25:1243-6.
7. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-36.
8. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 81:1072-82.
9. Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marban E, Seharaseyon J (2001) Pharmacological comparison of native mitochondrial K(ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels. *Mol Pharmacol.* 59:225-30.
10. Jung O, Englert HC, Jung W, Gogelein H, Scholkens BA, Busch AE, Linz W (2000) The K(ATP) channel blocker HMR 1883 does not abolish the benefit of ischemic preconditioning on myocardial infarct mass in anesthetized rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361:445-51.
11. D'ahan N, Moreau C, Prost AL, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A, Vivaudou M (1999) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12162-7.
12. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E (1998) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97:2463-9.
13. Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A (1999) ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol* 519:347-60.
14. García-Rivas GJ, Guerrero-Hernández A, Guerrero-Serna G, Rodríguez-Zavala JS, Zazueta C (2005) Inhibition of mitochondrial calcium uniporter by oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in post-ischemic rat heart. *FEBS J* 272:3477-88.
15. Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E (2001) Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 88:802-9.
16. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1404-7.
17. Crompton M, Costi A (1990). A heart mitochondrial Ca²⁺-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J* 266:33-9.
18. Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D (2004) Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 109:1714-7.
19. Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S, Takata K (1997) Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 241:693-7.
20. Seharaseyon J, Ohler A, Sasaki N, Fraser H, Sato T, Johns D C, O'Rourke B, Marban E (2000) Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral Kir gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 32:1923-30.
21. Grover GJ, Garlid KD (2000) ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 32:677-95.
22. Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11880-5.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

José Salud Rodríguez Zavala
Departamento de Bioquímica,
Instituto Nacional de Cardiología.
Correo E: rodjos@cardiologia.org.mx

Determinación del paso limitante en aldehído deshidrogenasas atípicas de *Escherichia coli*.

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son enzimas que oxidan a los aldehídos a sus correspondientes ácidos por medio de la utilización de NAD(P)⁺. La importancia de las ALDHs radica en que estas enzimas participan inespecíficamente en la destoxificación de aldehídos en los organismos pues pueden utilizar una gama amplia de estos compuestos. Las ALDHs se encuentran como dímeros o tetrámeros formados por subunidades idénticas [1-3]. Los tetrámeros de la ALDH1 y la ALDH2 poseen lo que se conoce como reactividad de medio sitio [4]. Esto es, a pesar de que la enzima contiene 4 sitios activos completos, solo dos de ellos presentan actividad. El rendimiento de este tetrámero es de 2 moles de NADH/mol de enzima, en lugar de 4.

El mecanismo general de reacción de las ALDHs se ilustra en la figura 1, donde se indica que los substratos se unen a la enzima de manera secuencial ordenada, uniéndose en primer lugar la coenzima. En la figura 1 se muestra también, el paso limitante de la reacción para los miembros de las ALDHs clase 1, 2 y 3. El paso limitante para la clase 1 es k₉, la liberación de la coenzima [5], para la clase 2 es k₇, la desacilación [6] y para la clase 3 es k₅, la transferencia del hidruro [7].

Para discernir el paso limitante de la reacción en estas enzimas se utilizan diferentes estrategias. Para determinar si el paso limitante es la transferencia del hidruro, se utilizan análogos del sustrato que faciliten o dificulten

la reacción. La utilización de aldehídos con el hidrógeno alfa substituido por deuterio, hará lenta la reacción, si el paso limitante es la transferencia del hidruro. La utilización de aldehídos con substituyentes aceptores de electrones como cloro o nitro en la molécula, también harán más lenta la reacción, si la transferencia del hidruro es el paso limitante.

Si el paso limitante no es la transferencia del hidruro, éste se encontrará entonces después de la formación del NADH. El hecho de que el paso limitante se encuentre después de la reducción de la coenzima, permite que se presente lo que se conoce como "burst" o "salto" antes del estado estacionario de la reacción [8]. Esto es posible debido a que el NADH después de formarse, permanece un tiempo en los sitios activos antes de ser liberado al medio y puede ser medido por fluorescencia excitando a 340 nm, y midiendo la fluorescencia emitida a 460 nm. Sin embargo, existe la posibilidad de que la fluorescencia del NADH unido a la enzima sea mayor que la del NADH al liberarse al medio de incubación (la fluorescencia del NADH es mayor en ambientes hidrofóbicos), y que por tanto la concentración del NADH determinada en los sitios activos se encuentre sobreestimada.

Otra característica de las ALDHs que se puede utilizar para la determinación del paso limitante es el efecto del Mg²⁺. Este ión activa la desacilación [6] e inhibe la liberación de la coenzima [9], mientras que no ejerce efecto sobre la transferencia del hidruro [7]. Se ha determinado que el Mg²⁺ hace mas fuerte la unión de la coenzima en ALDH1 y ALDH2, por lo anterior, el paso limitante de la reacción en ALDH1 se vuelve más lento. Por otro lado, al

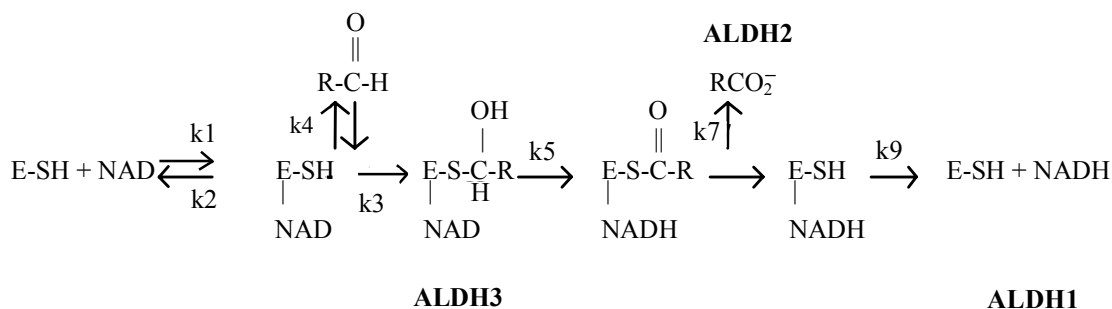


Figura 1. Mecanismo general de reacción de las aldehído deshidrogenasas.

TABLA 1

PAD	acetaldehído	α -(2 H)-acetaldehído	2-cloro-acetaldehído
Vmax (nmoles/min/mg)	3900	1800	670
ALD	benzaldehído	α -(2 H)-benzaldehído	p-nitro-benzaldehído
Vmax (nmoles/min/mg)	250	222	700

Efecto de diferentes sustratos sobre la actividad de PAD y ALD. La actividad se determinó adicionando la enzima en una celda conteniendo 100 mM de buffer de fosfatos pH 7.4 y 1 mM de NAD⁺ a 25 °C. La reacción se inició con la adición del aldehído.

TABLA 2

ALD		PAD	
t (s)	F (UA)	t (s)	F (UA)
121	2.3	117.6	2
121.7	2.3	118.6	2
122.3	2.3	119.5	2
122.9	2.3	120.5	2
123.4	2.3	121.6	2
124	3.3	122.4	2
124.5	2.3	123	2.1
124.6	2.8	124	2.4
124.8	3.1	124.8	2.7
125	3.96	126.4	3
125.4	4.97	127	3.6
125.8	5.33	127.8	3.8
127.2	5.45	128.7	4.2
128.3	5.53	129.4	4.4
129	5.58	130.2	4.7
130.3	5.64	131	5
131.4	5.7	131.7	5.2
132.5	5.76	132	5.5
133.8	5.84	133	5.7
134.9	5.9		
135.8	5.95		
136.9	6		
138	6.1		

Actividad de las enzimas PAD y ALD determinadas como fluorescencia dada por la producción de NADH a lo largo del tiempo. La actividad se determinó adicionando la enzima en una celda conteniendo buffer de fosfatos pH 7.4 y 1 mM de NAD⁺ a 14°C. La reacción se inició adicionando 1 mM propionaldehído. 1 nmol de NADH produce una señal de fluorescencia de 0.32 UA.

unirse el Mg²⁺ a la coenzima aumenta la nucleofilicidad de la cisterna 302, provocando que el paso limitante de la reacción en ALDH2 se haga más rápido [9].

Se han reportado dos ALDHs de *E. coli* K12 que participan en vías metabólicas específicas: la fenilacetaldehído deshidrogenada (PAD), que participa en el metabolismo de la fenilalanina (10) y la lactaldehído deshidrogenada (ALD), que participa en el metabolismo de la fucosa (12). La PAD se reportó como un dímero

(11) y la ALD como un tetrámero (12), aunque las dos enzimas poseen una extensión de alrededor de 60 aminoácidos en el N-terminal, característica de los tetrámeros, y no poseen la extensión de 17 aminoácidos en el C-terminal característica de las enzimas diméricas.

En un trabajo reciente encaminado a la caracterización detallada de estas enzimas para poderlas ubicar en alguna de las diferentes familias de las ALDHs, determinamos que la enzima PAD es un tetrámero [13]. Además, se ensayó el efecto de diferentes aldehídos sobre la actividad de estas enzimas. Los resultados se muestran en la tabla 1. También se analizó fluorométricamente la actividad enzimática para determinar la existencia de "burst". Los datos de fluorescencia a diferentes tiempos se muestran en la tabla 2. Finalmente se determinó el efecto del Mg²⁺ sobre la actividad de ambas enzimas, los datos se muestran en las tablas 3 y 4.

Analizar los datos presentados y determinar cual es el paso limitante de la reacción para las dos enzimas bacterianas.

TABLA 3

	Actividad de Deshidrogenasa (μ mol/min*mg)	% Actividad
Mg ²⁺ (mM)		
0	5.72	100
5	5.77	100.9
10	5.74	100.3

Efecto del Mg²⁺ sobre la actividad de deshidrogenasa de la enzima PAD. La actividad de la enzima se determinó en un buffer compuesto de 20 mM MOPS pH 7.4 y 1 mM de NAD⁺, variando la concentración de Mg²⁺ a 25 °C. La reacción se inició adicionando 1 mM de propionaldehído.

TABLA 4

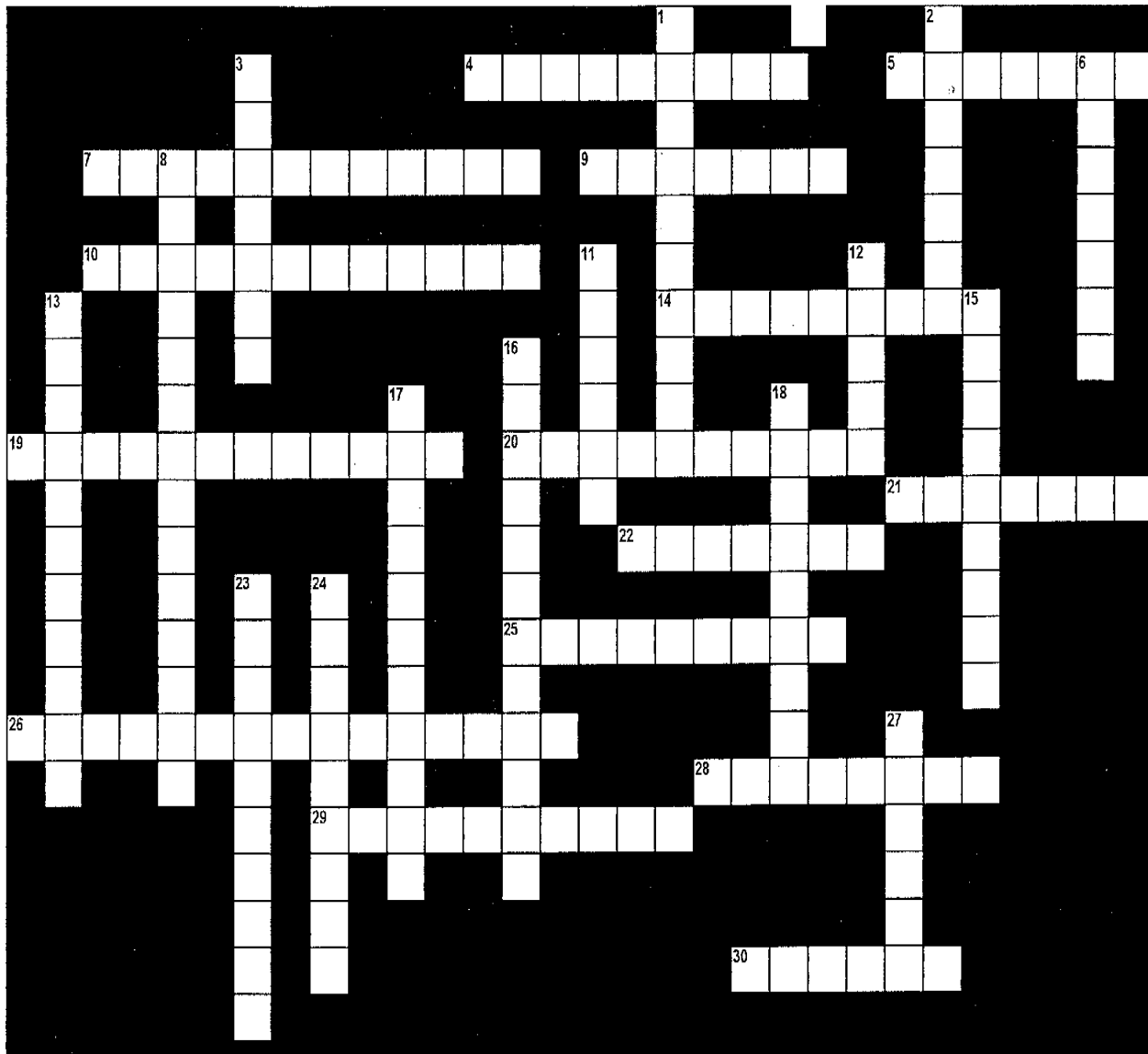
	Actividad de Deshidrogenasa (nmol/min*mg)	% Inhibición
Mg ²⁺ (mM)		
0	500	0
0.1	465	7
0.5	430	14
1	350	30
2	312	38
5	299	40
10	299	40

Efecto del Mg²⁺ sobre la actividad de deshidrogenasa de la enzima ALD. La actividad de la enzima se determinó en un buffer compuesto de 20 mM MOPS pH 7.4 y 1 mM de NAD⁺, variando la concentración de Mg²⁺ a 25°C. La reacción se inició adicionando 1 mM de propionaldehído.

CRUCIBIOQ

CUERPOS CETÓNICOS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@laguna.fmedic.unam.mx



HORIZONTALES

- 4 Es la concentración de cuerpos cetónicos en la sangre.
- 5 Sobreproducción de cuerpos cetónicos debida a un aumento en la concentración de ácidos grasos libres circulantes, ocasionado por la hidrólisis de los triacilgliceroles en el tejido adiposo.
- 7 Producto de la reacción en la que β -hidroxi- β -metilglutaril CoA pierde una molécula de acetil CoA en presencia de la enzima β -hidroxi- β -metilglutaril CoA liasa.
- 9 Durante el ayuno terapéutico en la obesidad, los cuerpos cetónicos desplazan en el cerebro a esta molécula, que es el principal combustible de las neuronas.

- 10 Situación en la que, durante el coma diabético, el pH sanguíneo baja debido a la alta concentración de cuerpos cetónicos y de ácido láctico.
- 14 Los cuerpos _____ se producen en el hígado durante la oxidación de los ácidos grasos, éste es un órgano que no los utiliza debido a la ausencia de la enzima acetoacetato: succinil CoA transferasa.
- 19 Mecanismo por el cual se forma acetoacetyl CoA a partir de dos moléculas de acetyl CoA.
- 20 Hormona que junto con glucagón, vasopresina y noradrenalina entre otras, acelera la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, todas ellas funcionan como agentes cetogénicos.
- 21 Tejido en el que la acción principal de la insulina, es inhibir la actividad de la lipasa sensible a hormonas, lo que conduce a una menor concentración de ácidos grasos libres.
- 22 Se forma por descarboxilación del acetoacetato de una manera espontánea, cuando su concentración en humanos es alta, el aliento tiene un olor característico.
- 25 Así se designa al aumento en la excreción urinaria de acetoacetato y β -hidroxibutirato.
- 26 Es el cuerpo cetónico más reducido, este compuesto se oxida en presencia de la deshidrogenasa específica y teniendo como cofactor al NAD^+ .
- 28 La secreción deficiente de esta hormona conduce a una oxidación excesiva pero incompleta de ácidos grasos en el hígado, hecho que ocasiona la sobreproducción de cuerpos cetónicos.
- 29 Molécula presente en membranas, es también precursora de hormonas esteroideas y ácidos biliares, el inicio de su síntesis es común con la de los cuerpos cetónicos ya que se condensan tres moléculas de acetyl CoA para dar lugar a β -hidroxi- β -metilglutaril CoA.
- 30 Además del riñón, es el único órgano que excreta a la acetona.
- 3 Enzima que interviene en la formación y degradación de acetoacetyl CoA, en la primera reacción a partir de dos moléculas de acetyl CoA y en la segunda liberándolas.
- 6 Acción que tiene la alta concentración de los cuerpos cetónicos sobre la velocidad de degradación de las proteínas en músculo.
- 8 Tejidos en los que la oxidación de cuerpos cetónicos es deficiente cuando la sobreproducción de éstos es elevada debido a diabetes mellitus.
- 11 Cuando en ella hay un nivel alto de acetoacetato, se frena la lipólisis del tejido adiposo.
- 12 Grupo al que pertenece la enzima que rompe a la beta-hidroxi-beta-metil glutaril coenzima A en acetoacetato y acetyl coenzima A.
- 13 Nombre de la vía generadora de cuerpos cetónicos, probablemente desencadenada por la lipólisis de triacilglicérols del tejido adiposo.
- 15 Es uno de los productos de la reacción mediante la cual el acetoacetato, en presencia de la β -cetoacil CoA transferasa (tioforasa), recibe una molécula de coenzima A.
- 16 La disminución en la concentración de este metabolito en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, limita la utilización de acetyl CoA para formar citrato y por ende se estimula la cetogénesis.
- 17 La concentración de cuerpos cetónicos que en humano durante el día es de 0.1 mM, después de una noche de ayuno pasa a 2.9 mM y en caso de ayuno prolongado puede subir hasta 7.0-8.0 mM; la explicación de este aumento es que son utilizados como _____ por el músculo, el riñón, el intestino y el cerebro.
- 18 Vía metabólica en el tejido adiposo que estimula la generación de cuerpos cetónicos.
- 23 Primera reacción de la secuencia en que los ácidos grasos reaccionan con la coenzima A en el citosol, para que posteriormente sean transportados como acil CoA a la mitocondria para su oxidación.
- 24 Reacción mediante la cual el acetoacetato capta hidrógenos y se transforma en β -hidroxibutirato.
- 27 Órgano donde se sintetizan el acetoacetato y el β -hidroxibutirato, posteriormente son exportados a la sangre y por ella se transportan a los tejidos periféricos.

VERTICALES

- 1 Proceso metabólico mediante el cual el β -hidroxibutirato puede decrecer la concentración sanguínea de los ácidos grasos, ya que disminuye la lipólisis y aumenta la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina.
- 2 En condiciones fisiológicas, la energía que requiere este órgano proviene de la glucosa; pero, en condi-

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

En presencia de α -(^2H)acetaldehído, la actividad de PAD disminuye más del 50%. Este efecto isotópico es indicativo de que el paso limitante de la reacción es la transferencia del hidruro. En presencia del acetaldehído con un sustituyente cloro, que es un grupo aceptor de electrones, la actividad de esta enzima fue solo un 15% de la actividad original. La disminución en la actividad en presencia de estos dos substratos muestra que el paso limitante de la reacción para PAD es la transferencia del hidruro. La actividad de la enzima ALD no fue afectada en presencia del substrato deuterado. La ausencia de efecto isotópico indica que el paso limitante de la reacción no es la transferencia del hidruro. En presencia del substrato con el sustituyente nitro, la actividad no solo no disminuyó, sino que se incrementó alrededor de 3 veces. Este efecto indica que el ataque nucleofílico (desacilación) está involucrado en el paso limitante de la reacción.

Graficando los datos de fluorescencia de la tabla 2 contra tiempo se obtienen las figuras 2 y 3.

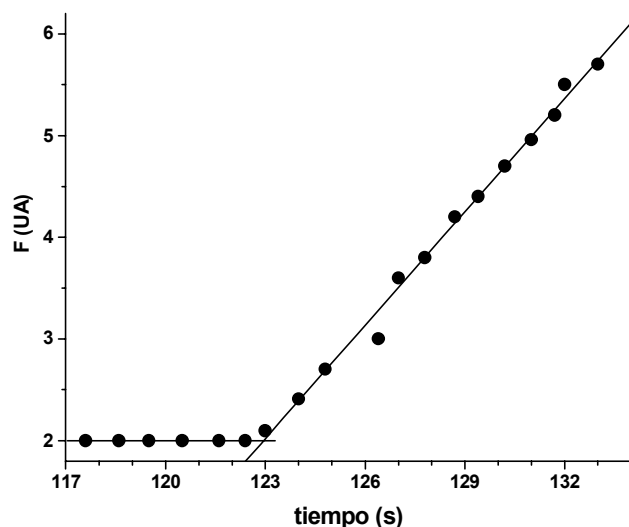


Figura 2. Actividad de deshidrogenasa de la PAD. La actividad se determinó adicionando 5 nmol de enzima en una cubeta que contenía 100 mM de buffer de fosfatos a pH 7.4 y 1 mM de NAD^+ a 14 °C.

En la figura 2 se observa que al adicionar el sustrato inmediatamente se inicia la reacción en el estado estacionario de la PAD, sin que se presente ningún salto en la actividad. Esta observación corrobora que el paso limitante para esta enzima es la transferencia del hidruro.

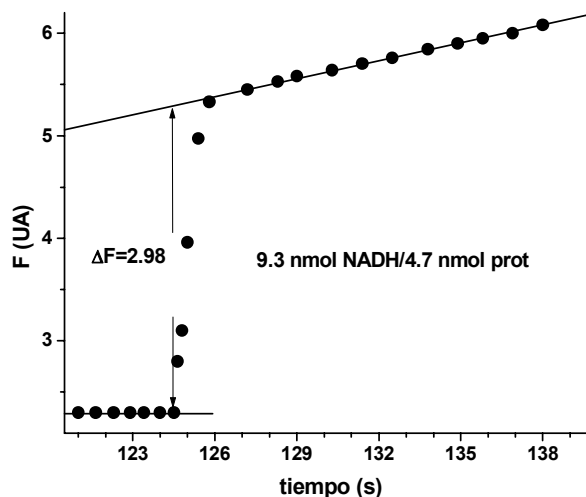


Figura 3. Determinación del burst antes del estado estacionario en la ALD. La reacción se llevó a cabo adicionando 4.7 nmol de ALD en una celda conteniendo 100 mM de buffer de fosfatos pH 7.4 y 1 mM NAD^+ . El ensayo se realizó a 14 °C para hacer lenta la reacción y captar más puntos en la región del "burst".

En cambio, cuando se adicionó el sustrato a la ALD, se observó un salto en la actividad antes de que la reacción alcanzara el estado estacionario (Fig. 3). Este resultado corrobora que el paso limitante para esta enzima se encuentra después de la formación del NADH. El ΔF del "burst" fue de 2.98 UF. Este valor fue interpolado en una curva de calibración de NADH generada en el fluorómetro (Fig. 4), y se determinó que es equivalente a 9.3 nmol de NADH. En el ensayo se utilizaron 4.7 nmol de enzima, por lo que al dividir el valor de 9.3 entre la enzima total se obtiene un rendimiento de 1.98 nmol NADH/nmol de enzima. Este resultado nos indica que la ALD posee reactividad de medio sitio como se ha reportado para las enzimas tetraméricas humanas ALDH1 y ALDH2 (4).

En la tabla 3 se observa que el Mg^{2+} no ejerció efecto sobre la actividad de la PAD cuando se utilizó hasta 10 mM del ión. Esto es consistente con las observaciones anteriores que indicaban que para la enzima PAD el paso limitante es la transferencia del hidruro.

Cuando se evaluó el efecto del Mg^{2+} sobre la actividad de la ALD, se observó que este ión inhibe en un 7% la actividad de la enzima a una concentración de 100 μM , mientras que, cuando se incrementa la concentración de Mg^{2+} a 10 mM se alcanza una inhibición del 40%. Esto sugiere

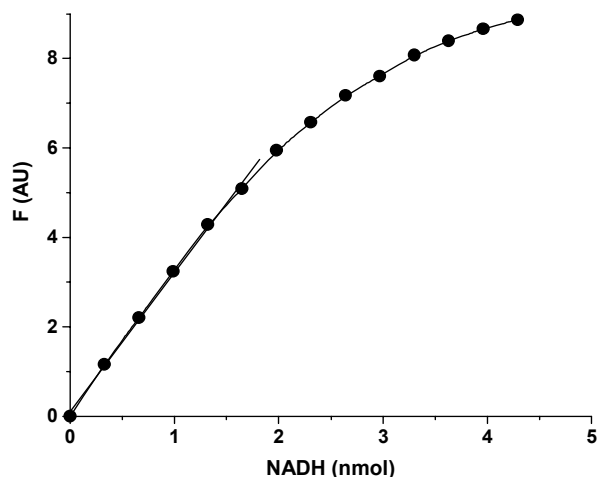


Figura 4. Curva de calibración de fluorescencia del NADH.

que en el paso limitante de la ALD, también interviene la liberación de la coenzima.

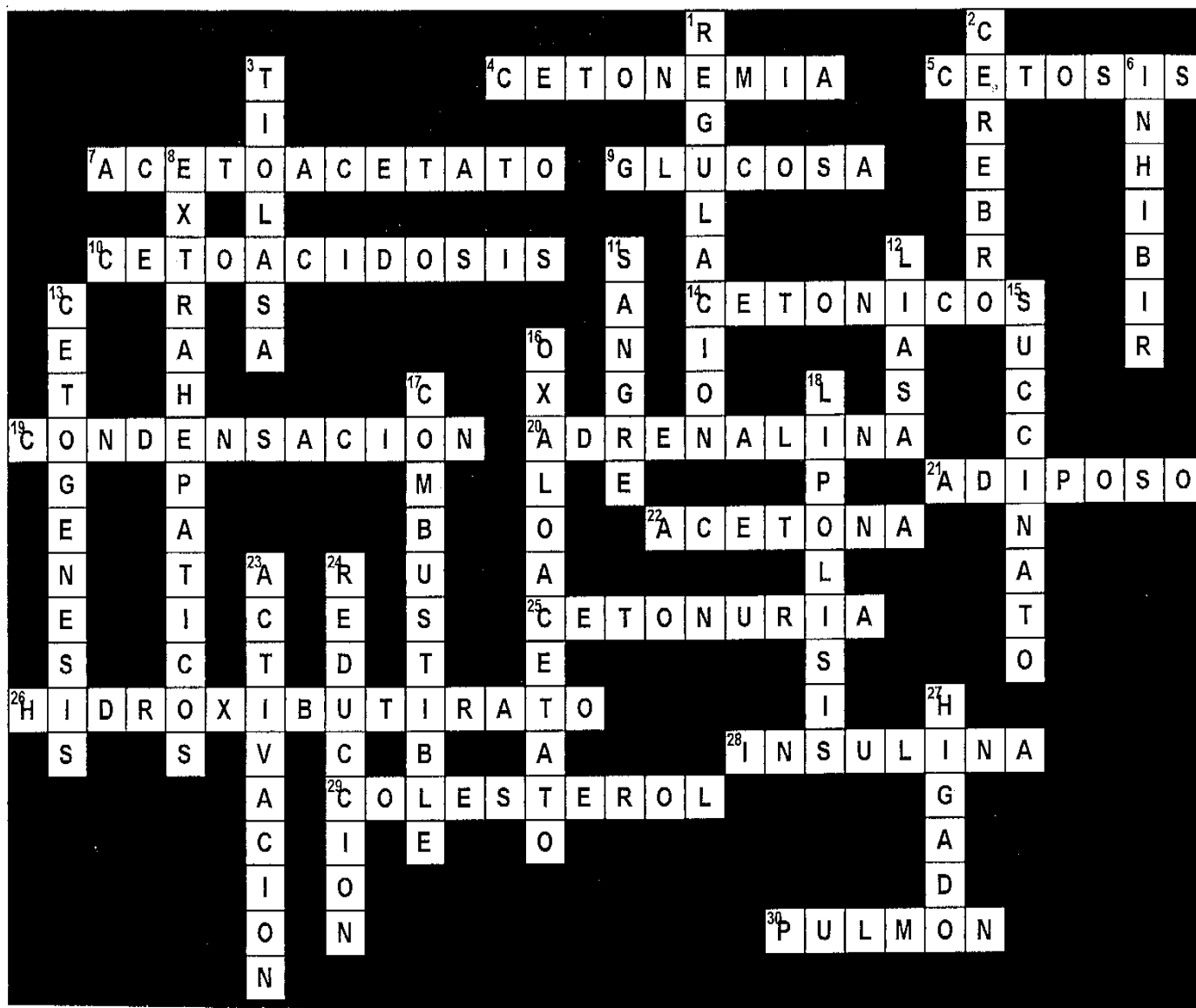
En resumen podemos concluir que el paso limitante de la PAD es la transferencia del hidruro [13]. Este resultado es novedoso ya que para las enzimas tetraméricas se ha determinado que el paso limitante se encuentra después de la formación del NADH [6, 7]. Por otra parte, el paso limitante de la reacción para la ALD parece estar influenciado por la desacilación y por la liberación de la coenzima [13]. Es decir, tanto k_7 como k_9 son comparablemente bajos y limitantes. Este resultado también es novedoso, ya que se ha determinado que en las aldehído deshidrogenasas tetraméricas existe un solo paso limitante de la reacción [6, 7]. La caracterización de estas ALDHs de *E. coli* con propiedades cinéticas *sui generis*, puede ser utilizada como base para el diseño de experimentos de mutagénesis sitio-dirigida, encaminados a determinar qué regula la actividad de las aldehído deshidrogenasas.

REFERENCIAS

1. Steinmetz CG, Xie P, Weiner H, Hurley TD (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5:701-11.
2. Liu ZJ, Sun YJ, Rose J, Chung YJ, Hsiao CD, Chang WR, Kuo I, Perozich J, Lindahl R, Hempel J, Wang BC (1997) The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD⁺ and the Rossmann fold. *Nat Struct Biol* 4:317-26.
3. Moore SA, Baker HM, Blythe TJ, Kitson KE, Kitson TM, Baker EN (1998) Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* 6:1541-51.
4. Weiner H, Hu JH, Sanny CG (1976) Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 251:3853-55.
5. MacGibbon AK, Buckey PD, Blackwell LF (1977) Evidence for two-step binding of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide to aldehyde dehydrogenase. *Biochem J* 165:455-62.
6. Wang XP, 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* 34:237-43.
7. Mann CJ, Weiner H (1999) Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. *Protein Sci* 8:1922-29.
8. Rout UK, Weiner H (1994) Involvement of serine 74 in the enzyme-coenzyme interaction of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 33: 8955-61.
9. Ho KK, Allali-Hassani A, Hurley TD, Weiner H (2005) Differential effects of Mg²⁺ ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry* 44:8022-29.
10. Halton SP, Hill TK, Flavell MA, Stringfellow JM, Cooper RA (1997) 2-Phenylethylamine catabolism by *Escherichia coli* K-12: gene organization and expression. *Microbiology* 143: 513-18.
11. Ferrandez A, Prieto MA, Garcia JL, Diaz E (1997) Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 406:23-7.
12. Baldoma L, Aguilar J (1988) Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: aerobic-anaerobic regulation of L-lactaldehyde dissimilation. *J Bacteriol* 170:416-21.
13. Rodriguez-Zavala JS, Hassani A, Weiner H (2006) Characterization of *E. coli* tetrameric aldehyde dehydrogenases with atypical properties compared to other aldehyde dehydrogenases. *Protein Sci.* En Prensa.

SOLUCIÓN CRUCIBIOQ

CUERPOS CETÓNICOS



SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2006

**XIV CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN
MEXICANA DE PROFESORES DE
BIOQUÍMICA, A. C.
31 de julio y 1° de agosto.**

y

**XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN
BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,
FACULTAD DE MEDICINA
2, 3 y 4 de agosto**

**Sede: Auditorio ALFONSO CASO
Universidad Nacional Autónoma de México**

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

La Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. (AMPB) convoca a todos los involucrados en el proceso de educación bioquímica, directivos, jefes de departamento, coordinadores de bioquímica o materias afines, organizadores de cursos y profesores, a que participen en el XIV Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. con sus trabajos, los cuales en esta ocasión, serán solamente presentados en forma de cartel y podrán ser objeto de discusión en una sesión oral durante el Congreso.

El XIV Congreso de la Asociación, se llevará a cabo los días 31 de julio y 1° de agosto del presente año en el Auditorio Alfonso Caso de la Universidad Nacional Autónoma de México, dentro del marco de la Semana de Educación Bioquímica 2006.

El tema central del Congreso será la "Enseñanza de la Bioquímica" lo que nos permitirá conocer la realidad al respecto en las carreras de Agronomía, Biología, Ciencias Químicas, Enfermería, Medicina, Nutrición, Odontología, Psicología, Veterinaria u otra en donde se enseñe bioquímica.

Por tal razón su trabajo puede abordar cualquiera de los siguientes temas:

- A. Planes de estudio, programas, materiales de apoyo (libros, prácticas u otros), índices de inscripción, porcentajes de acreditación, de reprobación, de deserción, etc.
- B. Investigación educativa.
- C. Diseño de material didáctico
- D. Otros

Para su participación en el Congreso es indispensable enviar un resumen que deberá estar escrito en letra Arial 10 a 11 puntos, con una extensión máxima de una cuartilla, a espacio sencillo y con un margen de 2.5 cm. por lado. El resumen del trabajo y la forma de registro se enviarán a más tardar el día 23 de junio del 2006, por correo electrónico a: reb@bq.unam.mx o se entregarán en papel y en disco a la señora Marivel Rojas García en las oficinas de la Asociación en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

COSTOS

Socios:	Inscripción y pago de Membresía anual	MN \$ 400.00
No socios:	Inscripción	MN \$ 500.00

El pago de inscripción al Congreso deberá efectuarse por depósito a la cuenta No. 0133718123 en el banco BBVA Bancomer, Sucursal Perisur (3517) a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C y la fotocopia del mismo deberá enviarse al mismo tiempo que su ficha de registro por vía electrónica o por fax a la señora Marivel Rojas García al número 01 (55) 5616 2419, asegurándose que en el anverso estén claros los datos del depositante y el sello del banco donde realizó su depósito.

La presentación del resumen debe apegarse al siguiente ejemplo:

EL ESTILO DE APRENDIZAJE EN RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO ACADÉMICO OBTENIDO EN BIOQUÍMICA
(renglón libre)

Hilda Flores Brito, Gustavo A. A. García Uriza y Artemio Cadena Meneses. Sección de Nutrición Animal. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo.

(renglón libre)

TEXTO...

COMITÉ ORGANIZADOR DEL CONGRESO

Dra. Yolanda Saldaña Balmori
balmori@laguna.fmedic.unam.mx

Dra. Virginia Sánchez Meza
virginia@laguna.fmedic.unam.mx

Dra. Rocío Salceda Sacanelles
rsalceda@ifc.unam.mx

INFORMES:

Sra. Marivel Rojas García reb@bq.unam.mx

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

Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apartado Postal 70-281, C. P. 04510, México, D. F. Para más información consulte la página web: <http://bq.unam.mx>

PROGRAMA

LUNES 31 de julio de 2006

9:00 - 11:00 h	Registro e Inscripciones Colocación de carteles
11:00 - 11:20 h	INAUGURACIÓN
11:20 - 12:20 h	CONFERENCIA “Medicina Genómica: Presente y Futuro” Dr. JAIME BERUMEN Jefe de la Unidad de Medicina Genómica, Servicio de Genética. Hospital General de México
12:20 - 12:40 h	RECESO
12:40 - 14:00 h	CONFERENCIA “Procedimientos para mejorar la disposición al aprendizaje” Dr. ABEL DELGADO Secretaría de Educación Médica, Facultad de Medicina, UNAM
14:00 - 16:30 h	RECESO
16:30 - 17:30 h	CONFERENCIA “Regulación del Metabolismo Hepático” Dra. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ Instituto de Fisiología Celular, UNAM
17:30 - 19:00 h	VISITA A CARTELES

MARTES 1º de agosto de 2006

8:00 - 9:00 h	Colocación de carteles
9:00 - 10:00 h	CONFERENCIA “Evaluación del Aprendizaje” Dr. ADRIÁN MARTÍNEZ GONZÁLEZ Secretaría de Educación Médica, Facultad de Medicina, UNAM
10:00 - 12:30 h	SIMPOSIO “Investigación Educativa” Coord. Mtro. MARTINIANO ARREDONDO GALVÁN Centro de Estudios Sobre la Universidad, UNAM
12:30 - 13:00 h	RECESO
13:00 - 14:00 h	VISITA A CARTELES
14:00 - 16:30 h	RECESO
16:30 - 18:00 h	CONFERENCIA “Biología Molecular y Genómica” Dr. VÍCTOR VALDÉS Facultad de Ciencias, UNAM
18:00 - 19:00 h	DISCUSIÓN DE CARTELES
19:00 - 19:30 h	SESIÓN DE NEGOCIOS y CLAUSURA

XIV CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A. C. FORMA DE REGISTRO

Fecha(dd/mm/aaaa): _____

Nombre: _____
Apellidos Paterno Materno Nombres

Correo E: _____

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 que imparte: _____

Departamento: _____

Escuela o Facultad: _____

Universidad: _____

Nombramiento: Tiempo completo ☐ Medio Tiempo ☐ Por horas ☐**Domicilio Institucional**

Calle y Número: _____

Colonia: _____ Ciudad: _____

Estado: _____ C.P. _____ Teléfono: _____ Fax: _____

Domicilio Particular

Calle y Número: _____

Colonia: _____ Ciudad: _____

Estado: _____ C.P. _____ Teléfono: _____ Fax: _____

Trabajos enviados al Congreso

Número de resúmenes enviados: _____

Título de el o de los trabajos:

1. _____

2. _____



SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA A.C.

**XXVI
CONGRESO
NACIONAL**



**12 AL 17 DE NOVIEMBRE, 2006
GUANAJUATO, GTO.**

INFORMACIÓN:
<http://smb.org.mx>



IIBE
INSTITUTO INSTITUCIONAL DE BIOLOGÍA



**IFC
UNAM**



MILLIPORE

BIO-RAD

Accretab

uniparts

**BECKMAN
Coulter**

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB)

La REB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y sus áreas afines. La Revista está dirigida a profesores y a estudiantes de licenciatura y de posgrado, por lo cual los trabajos que se sometan para su publicación deberán de ser suficientemente claros y explícitos. Los temas se deben de presentar de forma sencilla, organizada y que de manera gradual permitan la comprensión del trabajo.

Se aceptan contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones que se ajusten a los siguientes lineamientos editoriales:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 1) Portada. En el primer párrafo incluir el título, el cual debe de ser claro, simple, atractivo y evitar las abreviaturas o, en su caso, definir las al inicio del texto. En el siguiente párrafo se anotarán los nombres completos de los autores, iniciando por el nombre propio completo. La afiliación de los autores se escribirá en el siguiente párrafo, indicando el departamento, la institución, la ciudad y estado, el país y la dirección de correo electrónico del autor responsable. La afiliación de los autores se indicará con números entre paréntesis. Se proporcionará un título breve con un máximo de 60 caracteres.
- 2) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio, en "Times New Roman 12" como fuente de la letra, sin formato de texto, tabuladores o pies de página. Las figuras y tablas se presentarán separadas del texto.
- 3) Resumen. Se deberán incluir un resumen en idioma español y uno en inglés (Abstract) de no más de diez renglones.
- 4) Palabras clave. Se deberá proporcionar de tres a seis palabras clave en idioma español y en inglés.
- 5) Referencias. Se sugieren no más de 15 citas bibliográficas, tanto específicas como de lecturas recomendadas, lo que obliga a los autores a seleccionar aquellas referencias realmente importantes e informativas. Las referencias se indicarán en el texto con números entre paréntesis de acuerdo a su orden de aparición. Las referencias se enlistarán al final del trabajo y deben contener: apellidos e iniciales de todos los autores, año de publicación entre paréntesis, título completo del artículo y después de un punto, el nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen y antecedido por dos puntos, el número de la primera y última páginas, de acuerdo con el siguiente ejemplo:

Martin GM, Austad SN, Johnson TE (1996) Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature gen* 113:25-34.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood KJ (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The Molecular Biology of Immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, pp 81-104.

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

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 6) Figuras y Tablas. Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, incluyendo figuras y tablas. Las figuras se pueden presentar en formato "jpg" o integradas en un archivo de "Power Point" o del mismo "Word" separadas del texto del artículo. Las figuras deben de estar en blanco y negro, sin fondo ni sombreados. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales, separadas del texto del artículo. Las figuras y las tablas se deberán numerar con

arábigos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán presentar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja tamaño carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores de dos milímetros. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse 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 con la abreviatura, la primera letra mayúscula (Fig 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula (Tabla 2). Para la versión electrónica de la revista se pueden admitir figuras a color, en tal caso se deberán de enviar ambos formatos en blanco y negro y en color.

- 7) Abreviaturas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán definirse entre paréntesis, la primera vez que se utilicen.

II) OTRAS COMUNICACIONES

- 1) Los temas de las otras comunicaciones pueden ser muy variados; desde resúmenes de artículos científicos interesantes, relevantes o significativos, información científica o académica de interés general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo o comentarios de artículos publicados previamente en la REB, cartas al editor, etcétera.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita en no más de dos páginas.
- 3) Se aceptará un máximo de dos referencias que se incluirán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrá incluir una figura o una tabla, con las características que se indican en el inciso I-6.

Los manuscritos que no cumplan con las especificaciones de la revista no serán aceptados de primera instancia para su revisión. Los manuscritos serán evaluados por tres revisores, quienes opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor de dos meses. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas al autor responsable para su corrección e incorporación en el manuscrito. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la revista, en un lapso no mayor a 30 días; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. Una vez aceptado el trabajo, las pruebas de galera, se enviarán al autor responsable.

Los archivos electrónicos se deberán enviar a la Revista de Educación Bioquímica como archivos adjuntos (reb@bq.unam.mx), con atención al Editor en Jefe y a partir de una dirección de correo electrónico que será considerada como la dirección oficial para la comunicación con los autores. El autor responsable deberá identificar plenamente su adscripción con teléfono y dirección postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje se debe expresar la solicitud para considerar la posible publicación del artículo, el título del mismo, los nombres completos de los autores y su adscripción institucional, así como el número, tipo y nombre de los archivos electrónicos enviados.