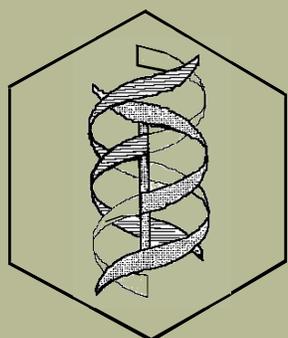


REB 2015

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. 34

No. 3

SEPTIEMBRE 2015

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

RAFAEL CAMACHO CARRANZA

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Medicina, Genómica y Toxicología Ambiental
Universidad Nacional Autónoma de México

ALICIA GAMBOA DE BUEN

Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA

Sección Bioquímica y Farmacología Humana
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA

Instituto Nacional de Pediatría

VÍCTOR M. VALDES LÓPEZ

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

ÁNGEL ZARAIN HERZBERG

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

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

CORRESPONSALES

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Coordinadora
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

SERGIO SÁNCHEZ-ARMÁSS ACUÑA

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

MARTHA ANGÉLICA QUINTANAR ESCORZA

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina Humana, Universidad Juárez del Estado de Durango

MARÍA MALDONADO VEGA

Departamento de Investigación. Centro de Innovación Aplicada en
Tecnologías Competitivas, AC. León, Gto., Mexico

ERIKA TORRES OCHOA

Universidad Autónoma de Baja California Sur
La Paz, B. C. S.

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

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB) La REB es una revista dedicada a la divulgación, difusión, discusión, análisis y presentación de resultados derivados de investigaciones originales en temas relevantes en el campo de la bioquímica y áreas afines. La REB es una 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; UNAM-Departamento de Bioquímica y Facultad de Medicina. Distribución electrónica: Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM (<http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/Reb/HomePage>). 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

¿COMPETENCIA O DESLEALTAD? Rafael Camacho Carranza José Victor Calderón Salinas.....	65
--	----

ARTÍCULOS

LAS HEMOGLOBINAS DE LAS BACTERIAS Reinier Gesto Borroto Raúl Arredondo Peter.....	66
---	----

LA CALRETICULINA ES UN COMPONENTE CENTRAL EN LA REGULACIÓN DE DIFERENTES PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS EN LA CÉLULA Miguel Ángel Velázquez Flores, Rodrigo Chan Torrano, Ruth Ruiz Esparza Garrido.....	72
---	----

OTRAS COMUNICACIONES

CRUCIBIOQ FUNCIONES DE LOS NUCLEÓTIDOS Yolanda Saldaña Balmori.....	81
---	----

PROBLEMA BIOQUÍMICO APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN INTEGRADA DE MICHAELIS-MENTEN PARA EL CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA CELOBIOSA DESHIDROGENASA EN PRESENCIA DE Fe ³⁺ Ileana Hernández- Reséndiz, Javier Belmont- Díaz y Sara Rodríguez- Enríquez.....	84
---	----

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ FUNCIONES DE LOS NUCLEÓTIDOS Yolanda Saldaña Balmori.....	86
---	----

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN INTEGRADA DE MICHAELIS-MENTEN PARA EL CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA CELOBIOSA DESHIDROGENASA EN PRESENCIA DE Fe ³⁺ Ileana Hernández- Reséndiz, Javier Belmont- Díaz y Sara Rodríguez- Enríquez.....	87
--	----

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....	89
---	----

EDITORIAL

¿COMPETENCIA O DESLEALTAD?

Recientemente una fuerte controversia surgió entre dos investigadores en China: Xie Can de la Universidad de Peking y Zhang Sheng-jia de la Universidad de Tsinghua. El punto de discusión gira en torno a la primacía del descubrimiento de una proteína sensible a los campos magnéticos, la cual estaría en la base fisiológica que subyace en el comportamiento de la navegación de los animales migratorios.

Zhang describe el comportamiento de células neuronales y musculares en un gusano, al ser sometidas a campos magnéticos sugiriendo a esta proteína sensible al magnetismo como responsable de tal comportamiento, trabajo que envió para su publicación a la revista *Science Bulletin*. La controversia surge porque, en versión de Xie, el descubrió esta proteína y mandó publicar su hallazgo a la revista *Nature Materials*, en la cual el artículo está en revisión; Xie asegura que de común acuerdo con Zhang, éste retendría su trabajo hasta que el trabajo de Xie fuera publicado. Sin embargo, Zhang se adelantó rompiendo el acuerdo.

Esta controversia y la disputa escaló hasta ser de interés para las autoridades de la Universidad de Tsinghua, las cuales formaron una comisión que analizó los alegatos y evidencias de ambas partes. Como resultado de este análisis, la Universidad de Tsinghua decidió despedir a Zhang, dando evidentemente la razón a Xie.

Zhang recibió un correo electrónico donde se le notificó su despido sin que, en opinión de Zhang, se diera explicación o razón alguna y sin que nadie de las autoridades o del aparato administrativo de la Universidad tomara la responsabilidad de esta decisión; por lo cual él ha decidido impugnar la resolución, con una demanda laboral.

Por otra parte, Xie está pidiendo retracción del artículo de Zhang a *Science Bulletin*, a lo cual Rui An, director editor, responde que no puede proceder a una nota de retractación hasta que la revista no tenga un comunicado oficial de parte de la Universidad Tsinghua, y acorde con las guías de la COPE (Committee on Publication Ethics), se cum-

plan los supuestos en los que se puedan basar para realizar dicha retractación (Nature doi:10.1038/nature.2015.18719).

Esta es una historia más de varias que recientemente han relucido a la luz pública en donde, los conceptos comunes éticos no son realmente consenso en las diversas comunidades científicas; los supuestos acuerdos que se tejieron entre los dos investigadores, sin que mediara la formalización adecuada, parece ser la punta del iceberg, ya que igualmente sorprendente es que la propia Universidad, que despide al investigador, tampoco cuide el respeto de derechos generales como la adecuada motivación y fundamentación de las acciones ejecutivas, así como el derecho de audiencia por parte de él o los involucrados, que serán afectados por una decisión tan drástica, que se convierte en juicio de valor, decisión legal y laboral y la exhibición al mundo científico de acciones faltas de ética de los afectados por la decisión.

Sirva este ejemplo para que el lector se pregunte y todos reflexionemos, en el ámbito de su esfera de trabajo, si las estructuras académicas de nuestro ámbito, pueden soportar o se están armando de las herramientas necesarias para asegurar un comportamiento ético individual y colectivo adecuado a las necesidades actuales; la competencia, los medios electrónicos, la comunicación instantánea y la globalización del conocimiento se convierten en armas de doble filo.

Rafael Camacho Carranza
Departamento de Medicina Genómica y
Toxicología Ambiental.
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM
rcamacho@biomedicas.unam.mx

José Victor Calderón Salinas
Departamento de Bioquímica.
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.
Instituto Politécnico Nacional.
Editor en Jefe
jcalder@cinvestav.mx

LAS HEMOGLOBINAS DE LAS BACTERIAS*

Reinier Gesto Borroto y Raúl Arredondo Peter**

Laboratorio de Biofísica y Biología Molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Ave. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México. **Autor de correspondencia correo E: ra@uaem.mx

RESUMEN

Durante los últimos años se han identificado genes de hemoglobina (*hb*) en organismos que pertenecen a los tres dominios de la vida. Estos genes se clasifican en las familias M, S y T. La familia M incluye a las flavohemoglobinas (fHbs) y a las Hbs de un solo dominio (SDgbs), la familia S incluye a los sensores acoplados a globinas (GCSs), a las protoglobinas (Pgbs) y a las globinas sensoras de un solo dominio (SSDgbs), y la familia T incluye a las Hbs truncadas (Hbts). En el dominio Eubacteria se han detectado todos los tipos de Hbs que se conocen (fHbs, SDgbs, GCSs, SSDgbs, Pgbs y Hbts), sin embargo, en el dominio Archaea solamente se han detectado GCSs, Pgbs, SSDgbs y Hbts. En esta revisión se describen aspectos generales sobre los avances recientes en el estudio de las Hbs bacterianas desde una perspectiva evolutiva, estructural y funcional.

PALABRAS

CLAVE:

Archaea, estructura, Eubacteria, evolución, función.

ABSTRACT

During the last years hemoglobin (*hb*) genes have been detected in organisms from the three domains of life. These genes are classified into the M, S and T Hb families. The M Hbs include flavohemoglobins (fHbs) and single-domain Hbs (SDgbs), the S Hbs include globin-coupled sensors (GCSs), protoglobins (Pgbs) and sensor single domain Hbs (SSDgbs), and the T Hbs include truncated Hbs (tHbs). The fHbs, SDgbs, GCSs, SSDgbs, Pgbs and tHbs have been detected in Eubacteria, however only the GCSs, Pgbs, SSDgbs and tHbs have been detected in Archaea. In this review we describe general aspects on the recent advances on the study of bacterial Hbs from an evolutionary, structural and functional perspective.

KEY WORDS:

Archaea, Eubacteria, evolution, function, structure.

GENERALIDADES SOBRE LAS HEMOGLOBINAS

Probablemente la hemoglobina (Hb) es la proteína más estudiada desde los puntos de vista molecular, estructural, funcional y evolutivo. Esta proteína confiere el color rojo a la sangre de los mamíferos, en donde funciona al transportar el O₂ desde los pulmones hasta los tejidos para la respiración aerobia de las células. Durante las últimas décadas la secuenciación de numerosos genomas ha permitido identificar genes de *hb* en organismos que pertenecen a los tres dominios de la vida, es decir, en Archaea, Eubacteria y Eukarya. Aunque existen variaciones en la secuencia de aminoácidos y en el grado de multimerización, la estructura terciaria de las Hbs se ha conservado a lo largo de la evo-

lución, desde las bacterias hasta los vertebrados. Esta estructura se conoce como el plegamiento del tipo globina, la cual consiste de 6 a 8 hélices α (las cuales se designan con las letras A a la H) que forman una región hidrofóbica en donde se localiza el grupo prostético hemo. A su vez, el hemo contiene a un átomo de Fe, el cual está coordinado por los cuatro grupos pirrol del hemo y por la His proximal del polipéptido. Como resultado, la sexta posición del Fe queda libre, lo que le permite unir ligandos gaseosos, tales como el O₂ y el óxido nítrico (NO). Además del transporte de O₂, las Hbs muestran una gran variedad de funciones ya que intervienen en reacciones de oxigenación, protección contra sulfuros, regulación de la expresión genética y el metabolismo celular, y en la inactivación del NO (1).

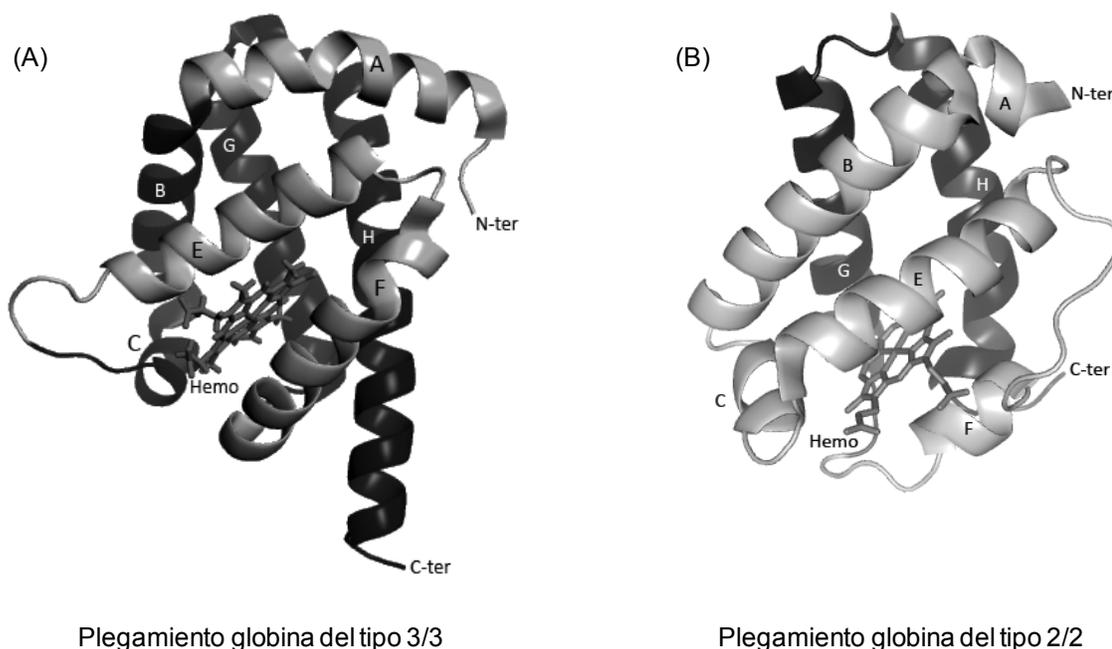


Figura 1. Disposición de las hélices α en la estructura terciaria de la Hb de *Vitreoscilla* (A) y la Hbt de *Chlamydomonas eugametos* (B) (Brookhaven ProteinDataBase ID 3TM9 y 1DLY, respectivamente). Las hélices se indican con las letras A a la H.

Se han identificado tres familias de Hbs: las familias M, S y T (2). La familia M incluye a las flavohemoglobinas (fHbs) y a las Hbs de un solo dominio (SDgbs), las cuales se han detectado en eucariontes y bacterias. La familia S incluye a los sensores acoplados a globinas (GCSs) y a las protoglobinas (Pgbs), los cuales se han detectado en bacterias, y a las globinas sensoras de un solo dominio (SSDgbs), las cuales se han detectado en procariontes y en eucariontes que pertenecen al reino Fungi. Estas familias presentan el plegamiento globina del tipo 3/3, en donde las hélices A, E y F se sobrepone a las hélices B, G y H (Fig. 1A). La familia T incluye a las Hbs truncadas (Hbts), las cuales se han detectado en bacterias, eucariontes unicelulares y plantas. Con base en la identidad en las secuencias de aminoácidos, las Hbts se dividen en las clases 1, 2 y 3. Las Hbts presentan un plegamiento globina del tipo 2/2, en donde las hélices B y E se sobrepone a las hélices G y H (Fig. 1B).

EL ORIGEN DE LAS HEMOGLOBINAS EN LAS BACTERIAS

El origen de la vida en la Tierra se estima en un tiempo anterior a los 4,100 millones de años. Se cree que la diversificación de la vida en tres dominios ocurrió a partir de un ancestro universal común (AUC), que

más que un sólo organismo correspondió a una comunidad de microorganismos que compartían genes entre sí. El tiempo de divergencia que dio lugar a los dominios Archaea y Eubacteria a partir del AUC se estima entre hace 4,100 y 3,900 millones de años. Es probable que el ancestro de las Hbs surgiera en las poblaciones del AUC como una adaptación a los cambios ambientales. Se cree que hace aproximadamente 3,500 millones de años la atmósfera de la Tierra era predominantemente anóxica, aunque existían regiones en donde la concentración de O_2 era elevada. En esas regiones la presencia de Hbs quizás permitió controlar la concentración de O_2 en las células ya que el O_2 es letal para los seres vivos (3).

Con base en el análisis de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las Hbs de bacterias, se propuso que el ancestro común de las Hbs era similar a las SDgbs que existen en la actualidad y que presentaban un plegamiento globina del tipo 3/3 (3). Sin embargo, Nakajima *et al.* (4), mediante el análisis del plegamiento de las SDgbs de plantas, encontraron que el módulo E/H de estas proteínas, el cual está formado por las hélices E a la H, presenta una similitud estructural elevada con el plegamiento globina del tipo 2/2 de las Hbts. Por esta razón, Nakajima *et al.* propusieron que el módulo E/H corresponde a la estructura terciaria ancestral, la cual evolucionó para dar lugar al plegamiento

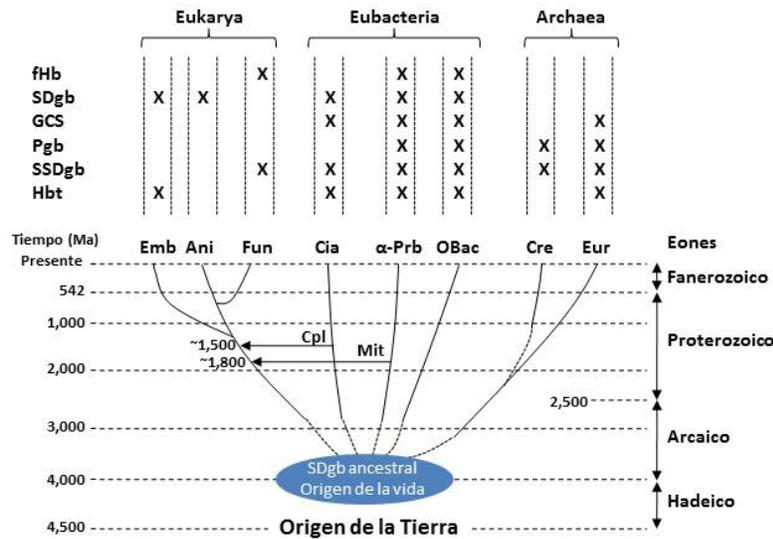


Figura 2. Eventos principales que ocurrieron durante la evolución de las Hbs en los tres dominios de la vida. Las "Xs" indican la existencia de Hbs en los grupos de organismos. Las flechas horizontales muestran los eventos que originaron a las mitocondrias (Mit) y los cloroplastos (Cpl). Abreviaturas: Emb: Embriófitas; Ani: Animales; Fun: Fungi; Cia: Cianobacterias; α -Prb: α -Proteobacteria; OBac: otras bacterias; Cre: Crenarchaeota; Eur: Euryarchaeota. Figura modificada de Vinogradov et al. (2) y Vinogradov et al. (3).

globina del tipo 3/3 de las Hbs actuales mediante la adición posterior del módulo que está formado por las hélices A a la C.

Se cree que el origen de las Hbs ocurrió en el ancestro de las eubacterias debido a que las tres familias de Hbs (M, S y T) solamente se han detectado en el dominio Eubacteria. Además, se ha propuesto que la fusión de genes *hb* ancestrales con genes que codifican para los dominios FAD/NAD(P)⁺ reductasa y transductor de señales, la cual dio lugar a las fHbs y a los GCS, respectivamente (ver la sección *Generalidades sobre la estructura de las hemoglobinas de las bacterias*), ocurrió después del surgimiento del dominio Eubacteria (2). Con base en el análisis de las secuencias de aminoácidos de las Hbs de bacterias, se propuso que las Hbts evolucionaron a partir de una Hb con plegamiento del tipo 3/3, la cual era similar a las Hbts de clase 1, y que a partir de ella surgieron las Hbts de clase 2 y, posteriormente, las Hbts de clase 3. Se cree que las Hbs actuales que están presentes en Eukarya son el resultado de una o más transferencias génicas horizontales a partir de organismos que pertenecían al dominio Eubacteria, las cuales ocurrieron concomitantemente al origen de las mitocondrias y los cloroplastos (hace 2,300 a 1,800 millones de años y 1,600 a 1,500 millones de años, respectivamente) (Fig. 2) (3).

GENERALIDADES SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS HEMOGLOBINAS DE LAS BACTERIAS

La estructura terciaria de las Hbs de las bacterias consiste en el plegamiento globina del tipo 3/3 o 2/2 (ver la sección *Generalidades sobre las hemoglobinas*) (Fig. 1). El plegamiento globina del tipo 3/3 es característico de la estructura terciaria de las SDgbs, SSDgbs, Pgbs y el dominio globina de las

fHbs y los GCSs. En cambio, las Hbts presentan un plegamiento globina del tipo 2/2.

La estructura terciaria de las fHbs consiste de un dominio N-terminal del tipo globina y un dominio con actividad de óxidoreductasa que se localiza en el extremo C-terminal (Fig. 3). El dominio globina de las fHbs se caracteriza por presentar la hélice H de mayor longitud al compararla con la hélice H de otras Hbs de bacterias. El dominio con actividad de óxidoreductasa contiene sitios de unión para los cofactores FAD y NAD(P)⁺. Este dominio se divide en dos subdominios: el subdominio que une al FAD, el cual está formado por 6 láminas β antiparalelas, y el subdominio que une al NAD(P)⁺, el cual está formado por 6 láminas β paralelas flanqueadas por dos hélices α por un lado y por una hélice α por el otro lado (Fig. 3) (5).

La estructura terciaria de las SDgbs corresponde a la estructura canónica de las Hbs con el plegamiento globina del tipo 3/3 (Fig. 1A). La SDgb de la bacteria ferruginosa *Vitreoscilla* fue la primera Hb de bacterias en ser cristalizada. Esta Hb se sintetiza cuando *Vitreoscilla*, que es una bacteria aerobia estricta, crece bajo condiciones de hipoxia (6).

La estructura terciaria de los GCSs consiste de un dominio sensor (que corresponde a un dominio del tipo globina) que se localiza en el extremo N-terminal, al cual se une el O₂ (y otros ligandos gaseosos, como el NO), y un dominio transductor de señales que se localiza en el extremo C-terminal, el cual es similar a los transductores aerotáticos de *Escherichia coli*. Los primeros GCSs que se caracterizaron fueron los transductores aerotáticos de *Halobacterium salinarum* y *Bacillus subtilis* (7). Hasta el momento solo se conoce la estructura cristalográfica del dominio globina de los GCSs de *B. subtilis* (Brookhaven ProteinDataBase ID 1OR4) y

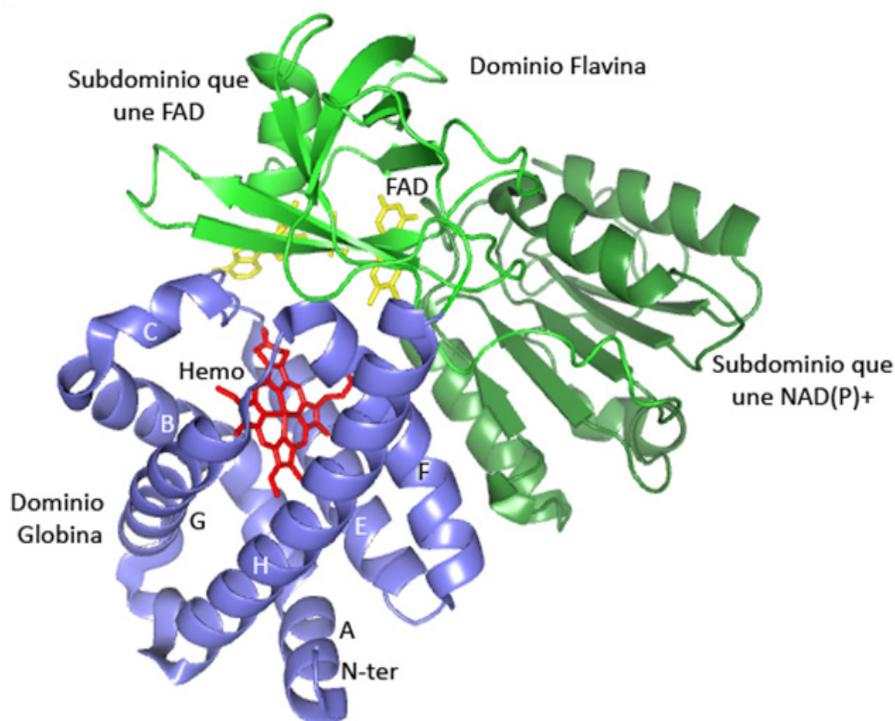


Figura 3. Estructura terciaria de la fHb de *Cupriavidus necator* (Brookhaven ProteinDataBase ID 1CQX). El dominio globina y los subdominios que unen FAD y NAD(P)⁺ se muestran en color azul, verde claro y verde oscuro, respectivamente. El grupo hemo y el FAD se muestran en color rojo y amarillo, respectivamente. Las hélices en el dominio globina se indican con las letras A a la H.

Geobacter sulfurreducens (Brookhaven ProteinDataBaseID 2W31). El dominio transductor de señales no se ha logrado cristalizar por lo que se desconoce su estructura terciaria.

La estructura de la Pgb de *Methanosarcina acetivorans* (Brookhaven ProteinDataBase ID 2VEB) es la única estructura cristalográfica de Pgbs que se conoce. La estructura terciaria de esta proteína consiste en el plegamiento globina del tipo 3/3, el cual está precedido por una pre-hélice A.

Las Hbts deben su nombre a que la longitud de las primeras Hbts que se describieron era aproximadamente 20 a 40 aminoácidos menor que la longitud de las SDgbs. Se ha dilucidado la estructura cristalográfica de varias Hbts de bacterias. Por ejemplo, se conoce la estructura terciaria de la Hbt de clase 1 de *Mycobacterium tuberculosis* (Brookhaven ProteinDataBase ID 1S56), la Hbt de clase 2 de *Agrobacterium tumefaciens* (Brookhaven ProteinDataBase ID 2XYK) y la Hbt de clase 3 de *Campylobacter jejuni* (Brookhaven ProteinDataBase ID 2IG3). En la estructura terciaria de las Hbts de bacterias la hélice A está prácticamente ausente, y la región CD-D está reducida a alrededor de tres aminoácidos. Además, la mayor parte de la hélice F de las Hbts está sustituida por un segmento en conformación extendida, seguido por la hélice F que consiste de una sola vuelta (8). En las Hbts de bacterias la migración de ligandos desde el solvente hasta el sitio distal del empaque hemo aparentemente ocurre a través de túneles: el túnel LT (por

sus siglas en Inglés "Long Tunnel"), que se localiza entre las hélices B y E, el túnel STG8 (por sus siglas en Inglés "Short Tunnel"), que se localiza entre los aminoácidos que se ubican en la posición G8 y H11 de las hélices G y H, respectivamente, y el túnel que se conoce como puerta E7 (Fig. 4). El análisis por mutagénesis dirigida sugiere que la migración de ligandos en el interior de estos túneles está regulada por la arquitectura interna de cada túnel (9).

LA DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DE LAS HEMOGLOBINAS EN LAS BACTERIAS

En las bacterias se han detectado fHbs, SDgbs, GCSs, SSDgbs, Pgbs y Hbts. Al analizar 2,415 genomas de bacterias Vinogradov *et al.* (10) mostraron que la distribución de las Hbs en estos genomas no es uniforme. En el dominio Archaea solamente detectaron GCSs, Pgbs, SSDgbs y Hbts de clase 1 en 32 de los 140 genomas que analizaron. En cambio, en el dominio Eubacteria detectaron todos los tipos de Hbs que se han descrito hasta el momento, aunque solamente detectaron Hbs en 1,185 de los 2,275 genomas que analizaron. Entre los grupos del dominio Eubacteria que contienen la mayor cantidad de Hbs se encuentran las α - y β -proteobacterias, en las cuales se detectaron Hbs en 183 de 256 y 121 de 144 genomas, respectivamente (10).

La función aparente de las fHbs consiste en inactivar el NO mediante la actividad de NO dioxigenasa. Esta actividad se lleva a cabo mediante un ciclo en

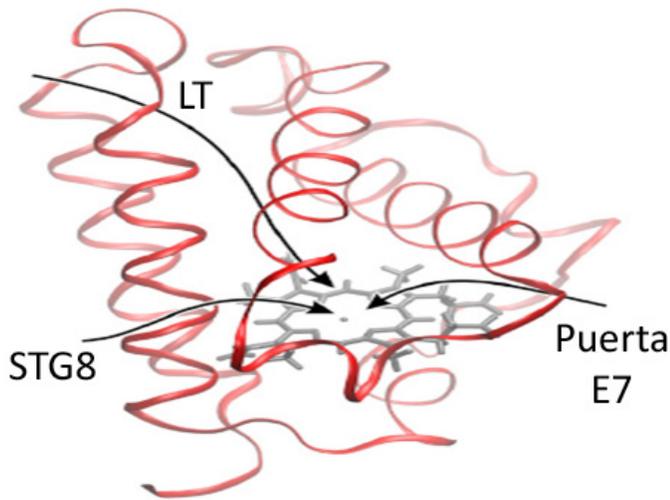


Figura 4. Túneles propuestos para el acceso de ligandos gaseosos al Fe del hemo de las Hbts bacterianas. Los túneles LT, STG8 y Puerta E7 se indican con flechas. El hemo se muestra con color gris. Figura modificada de Boron et al. (9).

el que la fHb ferrosa oxigenada ($\text{fHb}^{2+}\text{O}_2$) reacciona con el NO para producir NO_3^- y fHb en la forma férrica (fHb^{3+}). Posteriormente, fHb^{3+} es reducida a fHb^{2+} por la transferencia de 2 electrones del NAD(P)H al FAD y la subsecuente transferencia de 1 electrón del FAD al Fe^{3+} del hemo. Este proceso regenera a la fHb^{2+} , la cual es capaz de unir nuevamente NO después de oxigenarse. El NO es una molécula que modula numerosos aspectos en la fisiología de los seres vivos, incluyendo a los mecanismos de defensa en respuesta al ataque por microorganismos patógenos. El NO es tóxico para las bacterias patógenas, sin embargo, en estas bacterias la síntesis de fHbs que inactivan el NO contrarresta los mecanismos de defensa de las células infectadas (11).

La función aparente de las SDgbs es facilitar la difusión del O_2 hasta las oxidasas terminales que se localizan en la membrana de las bacterias. Igualmente, se ha propuesto que la SDgb de *Vitreoscilla* (VitSDgb) podría funcionar al regular la expresión genética ya que la expresión del gen *vitsdgb* en *E. coli* afecta los niveles de proteínas de diferentes vías metabólicas (12).

Una de las funciones probables de los GCSs es actuar como transductores aerotácticos al mediar respuestas aerofílicas y aerofóbicas en *B. subtilis* y *H. salinarum*, respectivamente (7). Además, se ha demostrado que los GCSs de *E. coli* y *Bordetella pertussis* poseen actividad diguanilatociclasa e

intervienen en la síntesis del diGMP cíclico (diGMPc) (13). En las bacterias el diGMPc es un segundo mensajero que está involucrado en la movilidad, virulencia, desarrollo, comunicación célula-célula y formación de biofilmes. Por lo tanto, es posible que en las bacterias los GCSs funcionen al regular procesos metabólicos que son activados por el diGMPc.

Se conoce poco acerca de la función de las Pgbs y SSDgbs. No obstante, recientemente se demostró que la Pgb^{2+} de *M. acetivorans* posee actividad de nitrito reductasa al reducir NO_2^- a NO. Además, cuando esta Pgb se encuentra en la forma férrica (Pgb^{3+}) interviene en la isomerización del peroxinitrito a NO_3^- (14). Estos resultados sugieren que las Pgbs intervienen en la biosíntesis y eliminación de las especies reactivas del N_2 y O_2 .

Las Hbts muestran una variedad amplia de funciones. Por ejemplo, las Hbts de clase 1 de *M. bovis* (15) y *M. tuberculosis* (16) inactivan el NO al funcionar como NO dioxigenasa mediante un mecanismo similar al descrito para las fHbs (ver arriba). Mediante análisis de cinética de estado estacionario en presencia de H_2O_2 se demostró que la Hbt de clase 2 de *M. tuberculosis* posee actividad peroxidasa (17), lo cual sugiere que esta proteína actúa en reacciones redox. Por su parte, la Hbt de clase 1 de la cianobacteria *Nostoc* posee constantes de asociación y disociación elevadas hacia el O_2 , lo que sugiere que esta proteína interviene en el transporte del O_2 (18).

CONCLUSIONES

El análisis reciente de las Hbs de las bacterias sugiere que las Hbs son proteínas que surgieron durante las etapas tempranas del origen de las primeras células, hace aproximadamente 4,100 a 3,900 millones de años. Al parecer, las Hbs ancestrales se diversificaron concomitantemente con la diversificación de las bacterias primigenias. Los resultados de este proceso consistieron en: (i) el surgimiento de dos linajes estructurales altamente conservados que corresponden al plegamiento globina de los tipos 2/2 y 3/3, (ii) la diversificación de las Hbs ancestrales en fHbs, SDgbs, GCSs, SSDgbs, Pgbs y Hbts, y (iii) la diversificación funcional de las Hbs en el metabolismo de las bacterias actuales, la cual incluye, entre otras funciones, transportar el O_2 , modular los niveles de NO y las especies reactivas del O_2 , regular la expresión genética y sintetizar mensajeros secundarios.



REFERENCIAS

1. Vinogradov SN, Moens L (2008) Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing. *J Biol Chem* 283:8773-8777.
2. Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Arredondo-Peter R, Guertin M, Gough J, Dewilde S, Moens L, Vanfleteren JR (2005) Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11385-11389.
3. Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Mizuguchi K, Dewilde S, Moens L, Vanfleteren JR (2007) A model of globin evolution. *Gene Struct Funct Genom* 398:132-142.
4. Nakajima S, Alvarez-Salgado E, Kikuchi T, Arredondo-Peter R (2005) Prediction of folding pathway and kinetics among plant hemoglobins using an average distance map method. *Proteins: Struct Funct Bioinf* 61:500-506.
5. Ermler U, Siddiqui RA, Cramm R, Friedrich B (1995) Crystal structure of the flavohemoglobin from *Alcaligenes eutrophus* at 1.75 Å resolution. *EMBO J* 14:6067-6077.
6. Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA (1986) Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature* 322:481-483.
7. Freitas TAK, Saito JA, Hou S, Alam M (2005) Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor. *J Inorg Biochem* 99:23-33.
8. Vuletich DA, Lecomte JT (2006) A phylogenetic and structural analysis of truncated hemoglobins. *J Mol Evol* 62:196-210.
9. Boron I, Bustamante JP, Davidge KS, Singh S, Bowman LAH, Tinajero-Trejo M, Carballal S, Radi R, Poole RK, Dikshit K *et al.* (2015) Ligand uptake in *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobins is controlled by both internal tunnels and active site water molecules. *F1000Research* 4:22.
10. Vinogradov SN, Tinajero-Trejo M, Poole RK, Hoogewijs D (2013) Bacterial and archaeal globins-A revised perspective. *Biochim Biophys Acta* 1834:1789-1800.
11. Crawford MJ, Goldberg DE (1998) Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohemoglobin gene: A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J Biol Chem* 273:34028-34032.
12. Tsai PS, Nageli M, Bailey JE (1996) Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome *o*. *Biotechnol Bioengin* 49:151-160.
13. Wan X, Tuckerman JR, Saito JA, Freitas TAK, Newhouse JS, Denery JR, Galperin M, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, Alam M (2009) Globins synthesize the second messenger Bis-(3'-5')-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. *J Mol Biol* 388:262-270.
14. Ascenzi P, Leboffe L, Pesce A, Ciaccio C, Sbardella D, Bolognesi M, Coletta M (2014) Nitrite-reductase and peroxynitrite isomerization activities of *Methanosarcina acetivorans* protoglobin. *PLoS One* 9:e95391.
15. Ouellet H, Ouellet Y, Richard C, Labarre M, Wittenberg B, Wittenberg J, Guertin M (2002) Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5902-5907.
16. Milani M, Pesce A, Ouellet H, Guertin M, Bolognesi M (2003) Truncated hemoglobins and nitric oxide action. *IUBMB Life* 55:623-627.
17. Ouellet H, Ranguelova K, LaBarre M, Wittenberg JB, Wittenberg BA, Magliozzo RS, Guertin M (2007) Reaction of *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin O with hydrogen peroxide: evidence for peroxidatic activity and formation of protein-based radicals. *J Biol Chem* 282:7491-7503.
18. Sarma H, Sharma BK, Tiwari SC, Mishra AK (2005) Truncated hemoglobins: a single structural motif with versatile functions in bacteria, plants and unicellular eukaryotes. *Symbiosis* 39:151-158.

LA CALRETICULINA ES UN COMPONENTE CENTRAL EN LA REGULACIÓN DE DIFERENTES PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS EN LA CÉLULA*

Miguel Ángel Velázquez Flores¹, Rodrigo Chan Torrano¹, Ruth Ruiz Esparza Garrido^{1,2}

¹Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México. Correo E: dr.velazquez.imss@gmail.com.

²Catedrática CONACyT, Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México. Correo E: rruizes@conacyt.mx

RESUMEN

La calreticulina es una proteína multifuncional que se identificó y caracterizó inicialmente en el retículo endoplásmico, y que posteriormente se identificó en otros compartimientos subcelulares, en donde regula diferentes procesos. Interesantemente, esta proteína es la única chaperona que se ha identificado en la superficie celular y que es secretada al torrente sanguíneo. La localización de la región amino terminal de la calreticulina, en el suero sanguíneo, forma parte de la firma de anticuerpos asociados con la detección del cáncer hepático y sugiere su utilización para la detección y/o diagnóstico de otros tipos de cáncer. Asimismo, estudios recientes demostraron que la calreticulina interacciona con la región 3'-UTR de los RNAs mensajeros del receptor tipo I de la angiotensina y del transportador de glucosa 1 para regular sus niveles de expresión.

PALABRAS

CLAVE:

Calreticulina, expresión proteica, localización subcelular, interactoma.

ABSTRACT

Calreticulin is a multifunctional protein that was initially identified and characterized in the endoplasmic reticulum, and further identified in different subcellular compartments to regulate a variety of cellular processes. Interestingly, this protein is the only chaperone that has been identified in the cell surface and which is secreted to the extracellular space. Since the amino-terminal region of the calreticulin is part of the antibodies signature to detect the hepatocellular carcinoma, it could also be useful for the detection and/or diagnosis of other types of cancer. Besides, recent studies showed that calreticulin interacted with the 3'-UTR regions of the Angiotensin Receptor Type I and glucose Transporter 1 messenger RNAs to regulate their expression levels.

KEY WORDS:

Calreticulin, protein expression, subcellular localization, interactome.

INTRODUCCIÓN

La calreticulina (CRT) es una proteína chaperona (46 kDa) que consiste de tres dominios estructurales y funcionales (1). El dominio P -rico en residuos de prolina- tiene solamente un sitio de unión a calcio (Ca^{2+}) de alta afinidad ($K_D = 1.6\mu\text{M}$; $B_{\text{MAX}} = 1\text{mol/mol}$ de proteína), mientras que el dominio carboxilo terminal (C-Terminal) tiene baja afinidad ($K_D = 0.03\text{-}2\text{ mM}$) y una alta capacidad³

($B_{\text{MAX}} = 20\text{-}50\text{mol/mol}$ de proteína) para la unión de este catión (2). El dominio amino terminal (N-terminal) contiene una secuencia señal que dirige a la CRT hacia el retículo endoplásmico (RE) y el C-terminal una secuencia KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) de retención en este compartimiento subcelular (Fig. 1). En el lumen del RE, la CRT, junto con otras chaperonas, participa en el plegamiento correcto de las proteínas (por medio de su sitio con actividad de lectina) y previene la agregación

*Recibido: 29 de julio de 2015 Aceptado: 27 de octubre de 2015

³ B_{MAX} . Número máximo de sitios de unión.

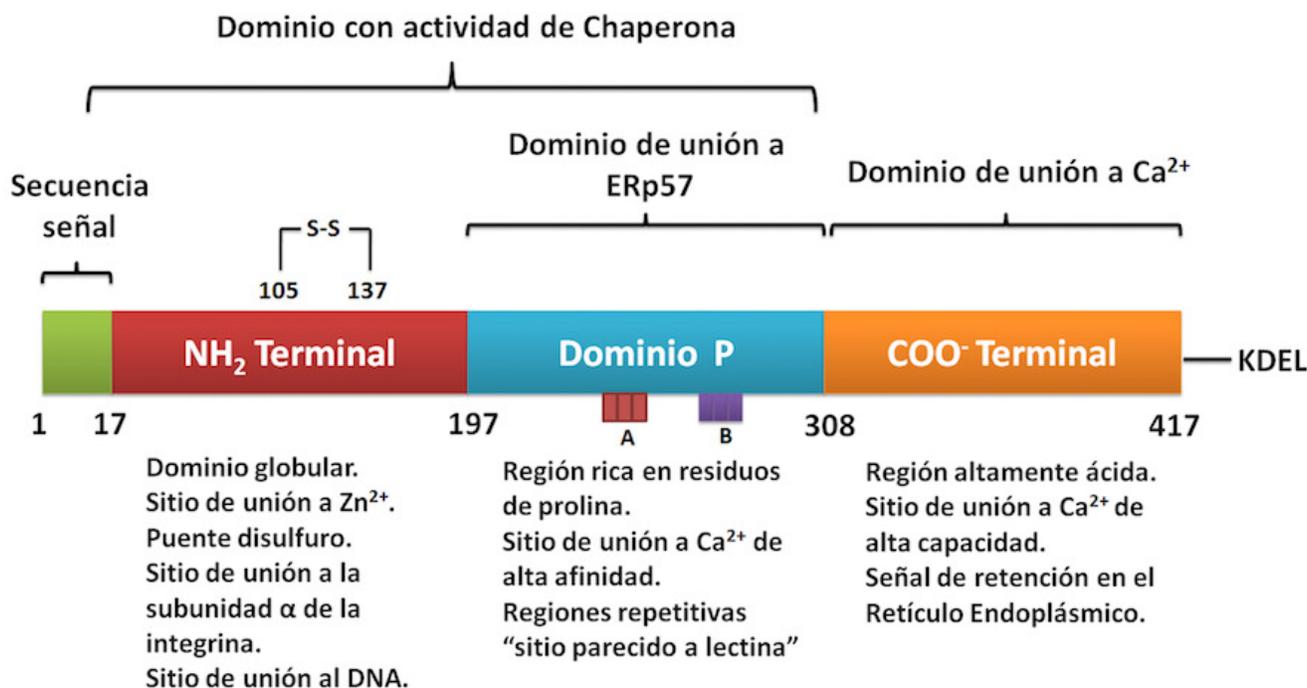


Figura 1. Dominios estructurales y funcionales de la calreticulina. La calreticulina posee sitios de unión a Ca²⁺ de baja y alta afinidad, así como una región que presenta repetidos de prolina (dominio P). En las regiones N y C terminales se localizan secuencia de localización y retención en el retículo endoplásmico, respectivamente. Tomada y modificada de Michalak et al. 2009.

proteica. Asimismo, la CRT identifica y dirige las proteínas mal plegadas hacia el proteosoma para su degradación. Otra función de la CRT en el RE es el control de la concentración de Ca²⁺ luminal, en donde el 50% de la concentración de este catión se asocia a esta proteína (3). Se ha observado que un incremento en los niveles de expresión proteicos se traduce en un mayor almacenamiento de Ca²⁺ en el RE (4-5), mientras que una disminución en su expresión resulta en una menor capacidad de almacenamiento de este catión (3) y en defectos durante el desarrollo del corazón del ratón (6-7). Además de su localización en el RE, la CRT se encuentra en diferentes compartimientos subcelulares (Fig. 2) para regular procesos celulares como son el procesamiento y presentación de antígenos en la respuesta inmune (8), la fagocitosis de las células cancerosas por medio de las células dendríticas (9), la fagocitosis de las células apoptóticas (10), así como la adhesión, migración y proliferación celular (11-12). También, la CRT participa en la regulación de la migración celular, al regular el desensamble de las adhesiones focales (13), y en la anoikis, la cual es un tipo de muerte celular que se caracteriza por la pérdida de la adhesión celular (14). Debido a la participación de la CRT en la regulación de diferentes procesos celulares,

esta proteína "clásica del RE" está emergiendo como un mediador crítico de diversos procesos fisiológicos y patológicos tales como la cicatrización cutánea, la respuesta inmune, la fibrosis y el cáncer (13-16).

LOCALIZACIÓN DE LA CRT EN LA MATRIZ EXTRACELULAR

Estudios iniciales demostraron que la CRT se localiza en la matriz extracelular (MEx) de la pre dentina dental (15) y que existe un incremento en la expresión de ésta en tejidos fibrosos (16). De acuerdo a esto, se sugiere que la CRT participa en la formación de la MEx y en la resistencia a la anoikis, ya que estos procesos son característicos durante la fibrogénesis.

En un modelo de arteroesclerosis, la CRT se localizó en la MEx de las arterias del conejo durante la remodelación vascular. Además, diferentes líneas de evidencia indican que la CRT se localiza en la fase insoluble a detergentes de la MEx de fibroblastos humanos en cultivo, y que ésta se transloca hacia la MEx en respuesta al tratamiento con ácido ascórbico. Dadas las interacciones que la CRT establece con colágenos fibrilares, con la laminina y con la TSP1 (Trombospondina 1), así

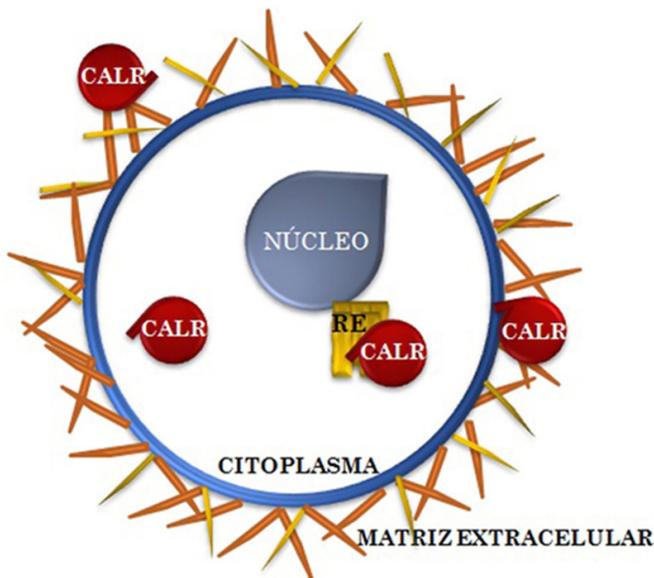


Figura 2. La calreticulina se localiza en distintos compartimentos subcelulares. La CRT se caracterizó inicialmente como una proteína residente exclusivamente del retículo endoplásmico (RE); sin embargo, estudios posteriores demostraron su presencia en el citoplasma, en la membrana celular y en la matriz extracelular. Según la región en la que se localice la CRT, va a ser la función que desempeña en un sistema.

como por su capacidad de modular la actividad de metaloproteinasas en la MEx, es factible que la CRT module la estructura y/o el intercambio de componentes en la MEx o bien, que esta proteína funcione como un "link" molecular entre la MEx y la superficie celular. Por lo tanto, se ha propuesto que en condiciones aberrantes, en las que la CRT ya no se incorpora a la MEx, la inducción de su secreción y su posterior interacción con componentes de la MEx podría restablecer los mecanismos moleculares alterados del sistema (17). En efecto, como se describe posteriormente, la aplicación ectópica de la CRT es determinante para la activación de la vía mediada por la PI3K (Fosfatidilinositol 3-Cinasa) en respuesta a TSP1 (13).

PARTICIPACIÓN DE LA CRT EN LA ADHESIÓN CELULAR

Uno de los primeros indicios de que la CRT regula la adhesión celular, surgió de un trabajo en el que se demostró que la unión de la CRT citoplásmica a la secuencia de aminoácidos KxGFFFKR⁴ (Lys-x-Gly-Phe-Phe-Phe-Lys-Arg), de la región intracelular de las integrinas, estabiliza la unión de las integrinas

con su ligando y activa a FAK (Proteína Cinasa de Adhesión Focal) (18). Asimismo, se observó que la CRT co-inmunoprecipita con integrinas durante la adhesión celular (18) y que se encuentra en complejos de adhesión focal junto con ciertas integrinas y LRP1 (Proteína 1 relacionada con el Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad) (19). Además de interactuar a nivel citoplásmico con las integrinas, la CRT - localizada en la superficie celular- se une a dominios extracelulares de la integrina $\alpha 2\beta 1$ (20) y a formas glicosiladas de la laminina para mediar la propagación de células de melanoma. Esto apoya la idea de que la CRT puede estar funcionando como un tipo de lectina en la adhesión celular (21).

CRT Y MIGRACIÓN CELULAR

La participación de la CRT en la migración celular está directamente relacionada con la formación y desensamble de las adhesiones focales, al estabilizar a las integrinas y de esta forma a la MEx. La expresión de la CRT en la superficie de las células endoteliales de la aorta del bovino y de los fibroblastos, facilita su interacción con la TSP1 soluble y de esta forma regula el desensamble de las adhesiones focales y la migración celular. La interacción de la CRT con la TSP1, por medio de los aminoácidos 19-36 de su región N-terminal, induce el acoplamiento del complejo CRT-TSP1 con el receptor LRP1 (22). La formación de este macrocomplejo (CRT-TSP1•LRP1) induce la activación de receptores acoplados a proteínas G αi , los cuales inhiben la producción del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPc), y activan la vía mediada por la PI3K, FAK y ERK (Proteínas Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares). Esto resulta en la disminución de la actividad de proteínas G pequeñas, de la familia Rho, lo que conlleva a la reorganización del citoesqueleto y a la pérdida de las adhesiones focales (13) (Fig. 3). En fibroblastos de ratones que no expresan la CRT, se observó que la activación de la TSP1 no tiene efecto sobre la activación de la vía PI3K-FAK-ERK; sin embargo, la aplicación exógena de la CRT es suficiente para inducir la activación de esta vía (13). Por lo tanto, la expresión de la CRT en la superficie celular es determinante en la regulación de las adhesiones focales por medio de la vía TSP1•PI3K-FAK-ERK.

CÁNCER Y LA RESPUESTA INMUNE

En un estudio realizado por Tufi y col. (23), se demostró que el proceso de destrucción de las células cancerosas, mediado por el sistema inmu-

⁴Secuencia KxGFFFKR. Motivo proteico altamente conservado en el dominio citoplásmico de las subunidad alfa de las integrinas.

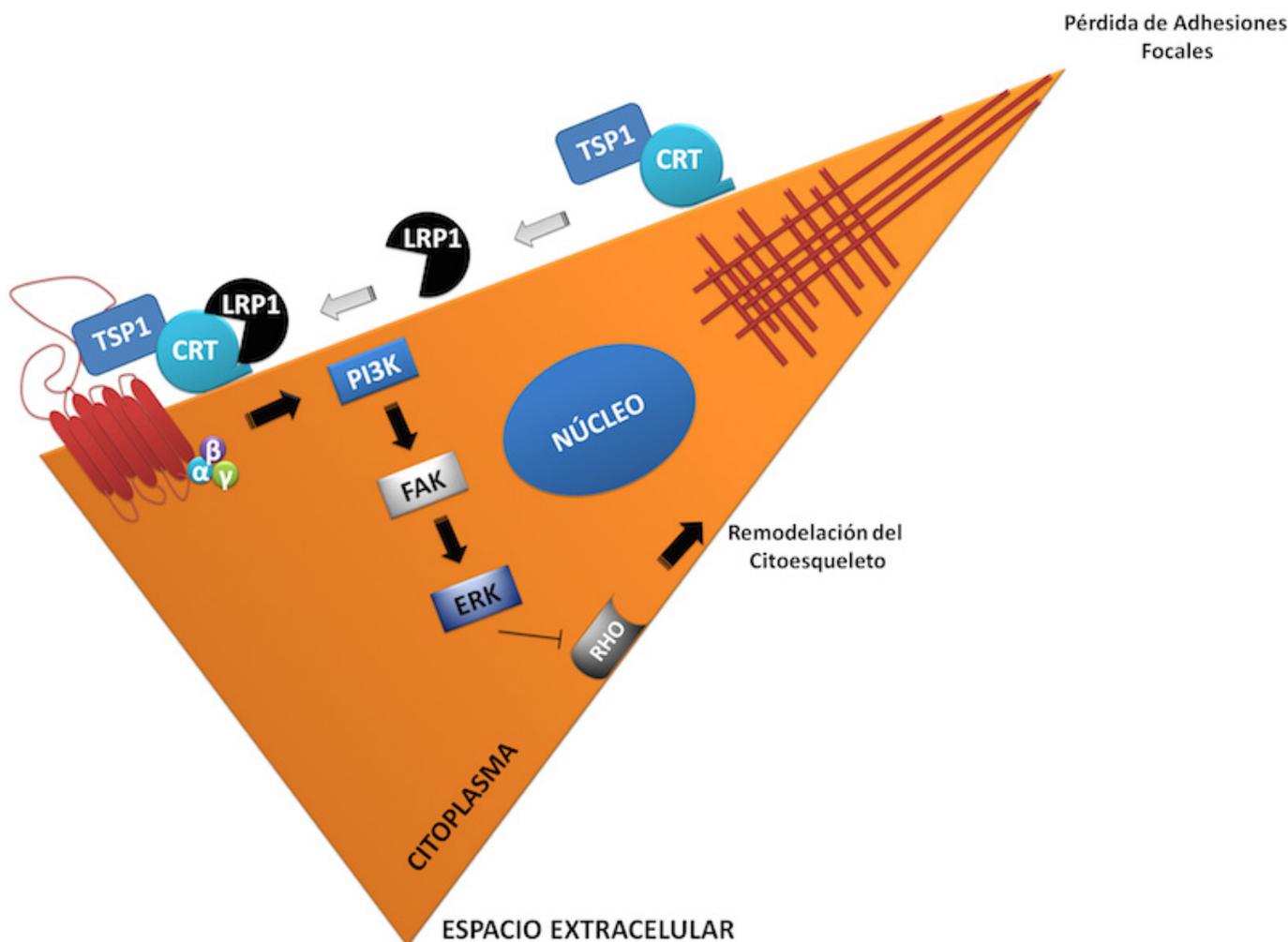


Figura 3. La localización de la CRT en la superficie celular induce la pérdida de las adhesiones focales de los fibroblastos. Cuando la CRT se localiza en la superficie celular, ésta se une al factor TSP1 soluble e interactúa con el receptor LRP1, lo cual induce la activación de la vía mediada por la PI3K. La activación de la PI3K disminuye la actividad de proteínas G pequeñas (Rho) y esto remodela el citoesqueleto para que se desensamblen las adhesiones focales.

ne, es dependiente de la localización de la CRT en la superficie celular. La aplicación de antraciclinas, así como de inhibidores específicos de la PP1 (proteína fosfatasa 1)/ PPR1 (Subunidad Reguladora 1A (Inhibidora) de la Fosfatasa 1)-involucrada en la desfosforilación de la proteína eIF2 α (Proteína Hiperfosforilada durante el estrés del RE) -, induce la translocación (en minutos) de la CRT a la superficie de células pre-apoptóticas y la remoción de éstas por las células dendríticas y linfocitos T primarios específicos para antígenos tumorales (24). La translocación de la CRT a la superficie celular, por antraciclinas, ocurre en respuesta a una disminución de Ca²⁺ en el RE y es seguida por la expresión y liberación de las proteínas de choque térmico Hsp90 (Proteína de

Choque Térmico, 90 kDa) y Hsp70 (Proteína de Choque Térmico, 70 kDa), así como por la liberación de la proteína HMGB1 (Proteína de Alta Movilidad del Grupo I) que actúa sobre el TLR4 (Receptor 4 parecido a Toll) en las células dendríticas (9). La interacción de la proteína HMGB1 con el TLR4 induce el procesamiento y la presentación de antígenos tumorales por las células dendríticas, lo cual facilita la activación de las células T y la generación de células T citotóxicas (CD8+), las cuales actúan en contra de las células neoplásicas (Fig. 4A). De forma similar, Gardai y cols. sugieren que la CRT, en la superficie celular de las células apoptóticas, es un ligando del receptor LRP1 y junto con la fosfatidilserina (PS), inactiva a la Molécula CD47 (CD47), lo cual resulta en la

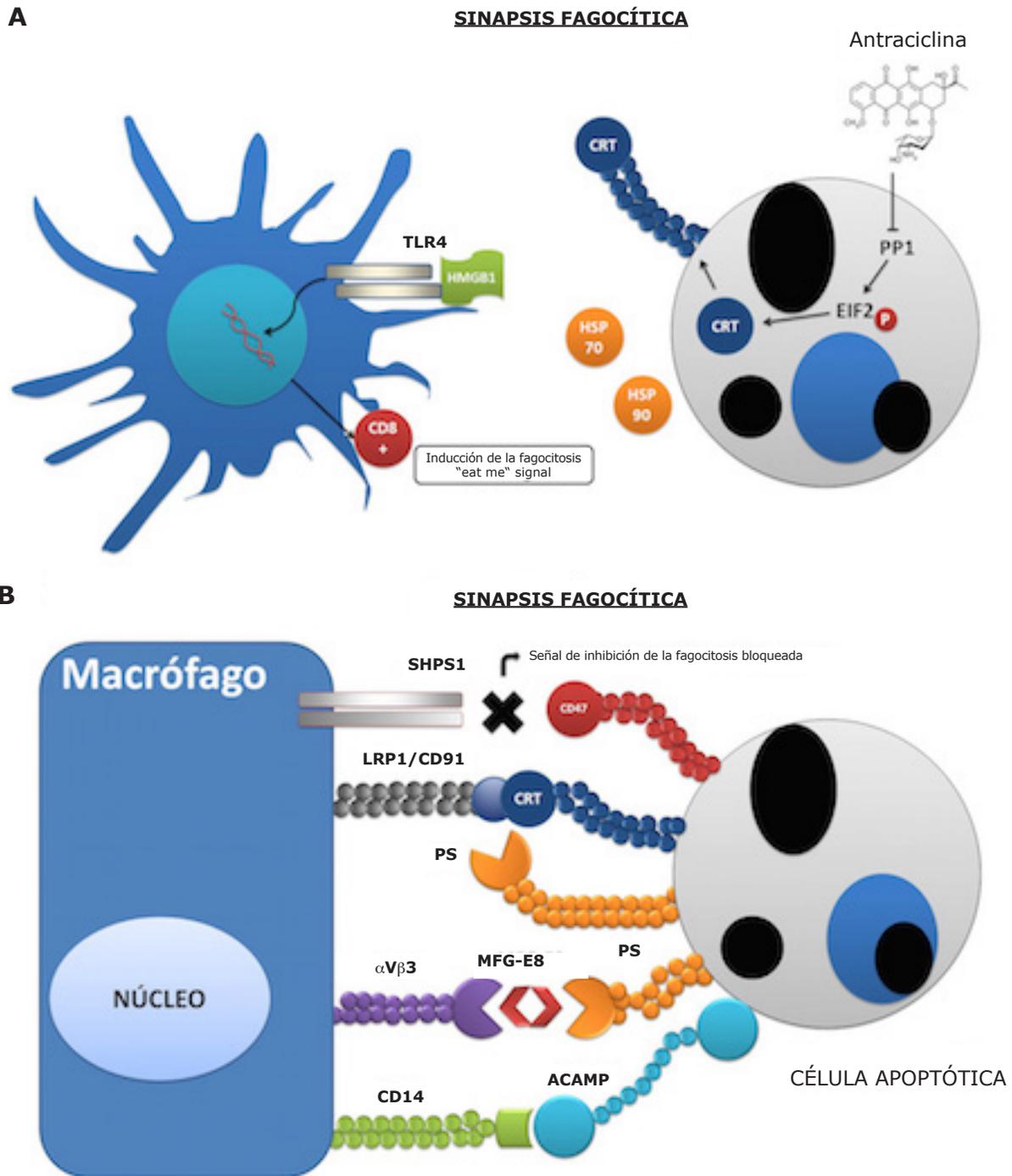


Figura 4. Sinapsis fagocítica entre una célula apoptótica y un macrófago. A) La inhibición de la fosfatasa 1 (PP1) por antraciclina inhibe la desfosforilación del Factor 2 de Iniciación Eucarionte (EIF2 α), lo cual induce la disminución de la concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE, y la translocación de la CRT hacia la superficie celular. De igual manera, se liberan las proteínas de choque térmico de 90 (HSP90) y 70kDa (HSP70), y de la Proteína de alta Movilidad del Grupo I (HMGBI) que actúa sobre el Receptor 4 Parecido a Toll (TLR4). B) La translocación de la CRT y de la fosfatidilserina (PS) hacia la superficie celular de las células apoptóticas facilita su interacción con el receptor LRP1/CD91 que es expresado en los macrófagos. Este reconocimiento proteico inhibe a CD47 y en consecuencia, la activación del receptor fagocítico SHPS1 (Proteína Alfa Reguladora de la Señal), el cual induce vías de señalización relacionadas con la inhibición de la fagocitosis. En la superficie celular, la PS puede interactuar con varios receptores fagocíticos, como la Integrina Alfa V (ITAV). CD14 funciona como un factor de inmovilización que reconoce a las ACAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Células Apoptóticas). Tomado y modificado de Gregory y Brown, 2005.

inactivación de vías de señalización –mediadas por SHPS1- que inhiben la fagocitosis (Fig. 4B). Las células que no expresan a la CRT en la superficie celular no se fagocitan por las células dendríticas; sin embargo, la aplicación exógena de la CRT restablece la fagocitosis de las células tumorales. Interesantemente, el tratamiento con antraciclinas de pacientes con leucemia mieloide aguda, produjo un incremento en la expresión de la CRT en células cancerosas circundantes, sugiriendo que la exposición de la CRT en la superficie de las células neoplásicas podría promover una respuesta positiva en la terapia contra el cáncer (25).

La presencia de la región N-terminal de la CRT (ecto CRT) en el suero sanguíneo, forma parte de la firma de los auto-anticuerpos que permiten la detección del cáncer hepático y se ha propuesto que esta región N-terminal es la responsable de la inducción de la reactividad inmune contra los antígenos tumorales. Por el contrario, se sabe que la CRT y las proteínas Hsp90 y Hsp70 tienen actividad anti-apoptótica, lo cual indica que estas proteínas podrían promover también la sobrevivencia de las células cancerosas. De hecho, la geldanomicina, inhibidor análogo de la proteína Hsp90, se utiliza en la clínica (fase I y II) para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (26).

Además de los mecanismos mencionados, la CRT ejerce otro tipo de efectos sobre la respuesta inmune. Para facilitar la respuesta inmune de las células T, la CRT forma un complejo con las proteínas TSP1, LRP1 y CD47 (Proteína Asociada a Integrinas) para mediar la adhesión y migración de estas células (27). Un punto importante es que la exposición de la CRT en la superficie celular es esencial para el reconocimiento y para la fagocitosis de las células neoplásicas por los macrófagos. Este proceso es independiente de la exposición de la PS y es importante en la inducción y secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α (Factor α de Necrosis Tumoral), las cuales activan la respuesta inmune. La presencia de la CRT en los gránulos de los linfocitos T citotóxicos y de las células "asesinas naturales" (natural killer cells), es necesaria para la interacción y formación de sinapsis que inducen la muerte celular de las células blanco (28).

Adicionalmente, Obeid (29) demostró que los péptidos inhibidores del complejo PP1/PPR1A se fusionan con moléculas que inducen la translocación de la CRT hacia la superficie celular de distintas líneas celulares tumorigénicas. Esto resulta en el incremento de la fagocitosis de las células tumorales, por las células dendríticas, y en la reducción

del crecimiento tumoral en modelos murinos de cáncer de colon, mama y fibrosarcoma. Por ende, el empleo de estos péptidos, para inducir la exposición de la CRT en la superficie de las células neoplásicas, podría tener un impacto clínico en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

IMPACTO CLÍNICO DE LA EXPRESIÓN DE LA CRT EN DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER

La correlación entre la expresión de la CRT y la tumorigénesis se ha estudiado ampliamente en diferentes tipos de cáncer (30) y la mayoría de los reportes indican que los tumores exhiben mayores niveles de expresión que los tejidos no neoplásicos (31-32). Asimismo, ciertos estudios muestran que los niveles de expresión de la CRT se correlacionan positivamente con la etapa clínica y con la metástasis -hacia los nodos linfáticos- en el cáncer gástrico (33) y de mama (34). Pacientes con cáncer de páncreas y de esófago, que mostraron una sobre-expresión en los niveles de la CRT, tuvieron una sobrevida pobre (35-36).

Otros estudios han revelado que la CRT se encuentra significativamente sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer y que este cambio en su expresión sirve como un biomarcador para detectar el cáncer de vejiga (37). De manera importante, el incremento en los niveles de la CRT en la orina permite diferenciar tumores malignos –alto grado- de tumores con un mejor pronóstico clínico –bajo grado- (37), lo que sugiere que la sobre-expresión de la CRT en el cáncer podría estar relacionada con la progresión tumoral. No obstante, la expresión de la CRT correlaciona positivamente con la respuesta a la quimioterapia de pacientes con cáncer de ovario (38) y con un mejor pronóstico de pacientes con neuroblastoma (39). Con base en lo anterior, la participación de la CRT en la formación y progresión tumoral parece depender del tipo celular y del estado clínico.

Recientemente, se detectaron mutaciones en el gen que codifica para la calreticulina (CRT) en neoplasmas mieloproliferativos (NMP) (40-41). La mayoría de los pacientes con NMP, incluyendo policitemia vera (PV), trombocitemia (TE) y mielofibrosis primaria (MFP), mostraron mutaciones en el gen JAK2 (Cinasa Janus2) (42-43) y el resto mostró mutaciones en el gen CRT, las cuales incluyen una pérdida de 52 pares de bases (pb) y una inserción de 5 pb que modifican el marco de lectura (44). Por lo tanto, las proteínas que son codificadas por este gen alterado carecen del dominio C-terminal KDEL, lo cual modifica su unión al Ca²⁺ y el crecimiento celular.

PARTICIPACIÓN DE LA CRT EN LA ESTABILIDAD DEL mRNA

Además de todo lo descrito anteriormente, la CRT funciona como una proteína de unión a RNA mensajero (mRNA). La CRT desestabiliza tanto al mRNA de AT1 (Receptor tipo I de la Angiotensina II) (45) como al del GLUT1 (Transportador de Glucosa 1) (46), al unirse a los extremos 3'-UTRs. Importantly, la desestabilización del mRNA del GLUT1 ocurre en condiciones de alta glucosa, lo cual puede tener un significado importante en la regulación de los niveles de glucosa durante el síndrome metabólico. Estos resultados aportan evidencia sobre una función nueva para la CRT en un sistema biológico.

CONCLUSIONES

La función de la CRT en un tipo celular determinado depende de diversos factores como son sus niveles de expresión y localización, así como de las interacciones proteína-proteína y proteína-mRNA que establece en la célula. Aun cuando cambios en su expresión y localización se han asociado con la desregulación de diversos procesos celulares, otros estudios son necesarios para identificar los mecanismos que rigen esta desregulación. Desde nuestro punto de vista, es necesario identificar las interacciones proteína-proteína y proteína-mRNA que la CRT establece en cada tipo celular y que determinan su función.



REFERENCIAS

1. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M (2009) Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 417: 651–666.
2. Baksh S, Michalak M (1991) Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J Biol Chem* 266(32):21458–65.
3. Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Muller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demaurex N, Opas M, Michalak M (2001) Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol* 154: 961–972.
4. Bastianutto C, Clementi E, Codazzi F, Podini P, De Giorgi F, Rizzuto R, Meldolesi J, Pozzan T (1995) Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J Cell Biol* 130: 847–855.
5. Mery L, Mesaeli N, Michalak M, Opas M, Lew DP, Krause KH (1996) Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* 271: 9332–9339.
6. Lynch J, Guo L, Gelebart P, Chilibeck K, Xu J, Molkentin JD, Agellon LB, Michalak M (2005) Calreticulin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical Ca²⁺-dependent signaling cascade. *J Cell Biol* 170: 37–47.
7. Guo L, Nakamura K, Lynch J, Opas M, Olson EN, Agellon LB, Michalak M (2002) Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse. *J Biol Chem* 277: 50776–50779.
8. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccosanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13: 54–61.
9. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G (2008) Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 15: 3–12.
10. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JA, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM (2005) Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123: 321–334.
11. Orr AW, Pallero MA, Xiong WC, Murphy-Ullrich, JE (2004) Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly. *J Biol Chem* 279: 48983–48992.
12. Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, Chesser A, Michalak M, Rahman M, Siebert JW, Gold LI (2008) Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J Pathol* 173: 610–630.
13. Goicoechea S, Pallero MA, Eggleton P, Michalak M, Murphy-Ullrich JE (2002) The anti-adhesive activity of thrombospondin is mediated by the

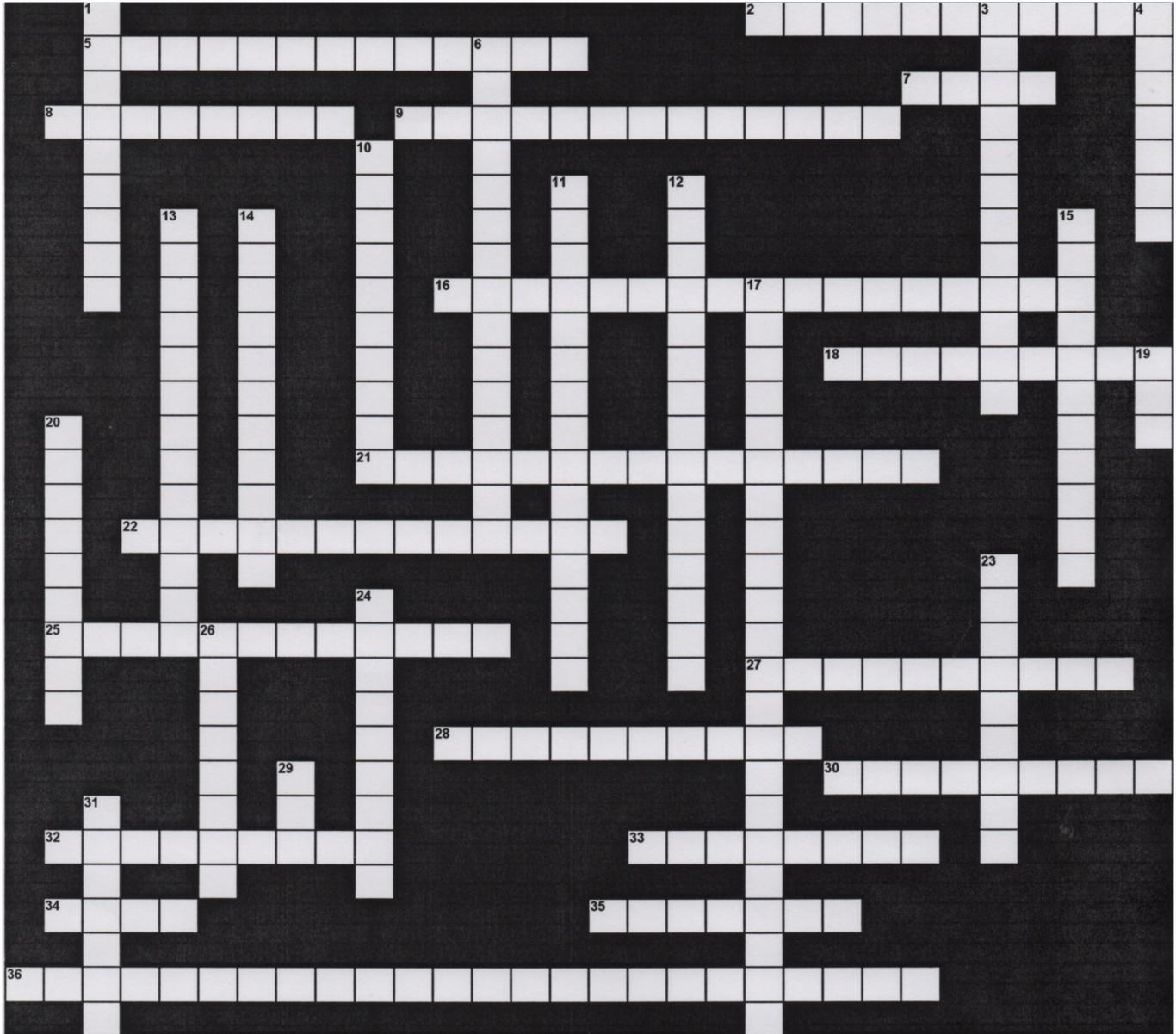
- N-terminal domain of cell surface calreticulin. *J Biol Chem* 277: 37219–37228.
14. Pallero MA, Elzie CA, Chen J, Mosher DF, Murphy-Ullrich JE (2008) Thrombospondin 1 binding to calreticulin-LRP1 signals resistance to anoikis. *FASEB J* 22: 3968–3979.
 15. Somogyi E, Petersson U, Hultenby K, Wendel M (2003) Calreticulin—an endoplasmic reticulum protein with calcium-binding activity is also found in the extracellular matrix. *Matrix Biol* 22: 179–191.
 16. Kypreou KP, Kavvadas P, Karamessinis P, Peroulis M, Alberti A, Sideras P, Psarras S, Capetanaki Y, Politis PK, Charonis AS (2008) Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis. *Proteomics* 8: 2407–2419.
 17. Eggleton P, Llewellyn DH (1999) Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. *Scand J Immunol* 49: 466–473.
 18. Coppolino M, Leung-Hagesteijn C, Dedhar S, Wilkins J (1995) Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem* 270: 23132–23138.
 19. Tran H, Pankov R, Tran SD, Hampton B, Burgess WH, Yamada KM (2002) Integrin clustering induces kinectin accumulation. *J Cell Sci* 115: 2031–2040.
 20. Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M (2005) Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol* 245: 91–121.
 21. White TK, Zhu Q, Tanzer ML (1995) Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading. *J Biol Chem* 270: 15926–15929.
 22. Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE (2003) Thrombospondin signaling through the calreticulin/ LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 116: 2917–2927.
 23. Tufi R, Panaretakis T, Bianchi K, Criollo A, Fazi B, Di Sano F, Tesniere A, Kepp O, Paterlini-Brechot P, Zitvogel L, Piacentini M, Szabadkai G, Kroemer G (2008) Reduction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels favors plasma membrane surface exposure of calreticulin. *Cell Death Differ* 15: 274–282.
 24. Viaud S, Terme M, Flament C, Taieb J, Andre F, Novault S, Escudier B, Robert C, Caillat-Zucman S, Tursz T, Zitvogel L, Chaput N (2009) Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha. *PLoS One* 4: e4942.
 25. Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, Fimia, GM, Kepp O, Piacentini M, Froehlich KU, van Endert P, Zitvogel L, Madeo F, Kroemer G (2008) The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 15: 1499–1509.
 26. Gehrman M, Radons J, Molls M, and Multhoff G (2008) The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells. *Cell Stress Chaperones* 13: 1–10.
 27. Forslow A, Liu Z, Sundqvist KG (2007) Receptor communication within the lymphocyte plasma membrane: a role for the thrombospondin family of matricellular proteins. *Cell Mol Life Sci* 64: 66–76.
 28. Sipione S, Ewen C, Shostak I, Michalak M, Bleackley RC (2005) Impaired cytolytic activity in calreticulin-deficient CTLs. *J Immunol* 174: 3212–3219.
 29. Obeid M (2009) Anticancer activity of targeted proapoptotic peptides and chemotherapy is highly improved by targeted cell surface calreticulin-inducer peptides. *Mol Cancer Ther* 8: 2693–2707.
 30. Lu YC, Weng WC, Lee H (2015) Functional roles of calreticulin in cancer biology. *Biomed Res Int* 2015;2015:526524.
 31. Armenian M, Veerakumarasivam A, Abdullah S, Rosli R (2013) Calreticulin and cancer. *Pathol Oncol Res* 19:149–154.
 32. Ruiz Esparza-Garrido R, Velázquez-Flores MÁ, Diegopérez-Ramírez J, López-Aguilar E, Siordia-Reyes G, Hernández-Ortiz M, Martínez-Batallar AG, Encarnación-Guevara S, Salamanca-Gómez F, Arenas-Aranda DJ (2013) A proteomic approach of pediatric astrocytomas: MiRNAs and network insight. *J Proteomics* 94: 162–75.
 33. Chen CN, Chang CC, Su TE, Hsu WM, Jeng YM, Ho MC, Hsieh FJ, Lee PH, Kuo ML, Lee H, Chang KJ (2009) Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 16: 524–533.
 34. Lwin ZM, Guo C, Salim A, Yip GW, Chew FT, Nan J, Thike AA, Tan PH, Bay BH (2010) Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod Pathol* 23: 1559–1566.
 35. Du XL, Hu H, Lin DC, Xia SH, Shen XM, Zhang Y, Luo ML, Feng YB, Cai Y, Xu X, Han YL, Zhan

- QM, Wang MR (2007) Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Med (Berl)* 85: 863–875.
36. Sheng W, Chen C, Dong M, Zhou J, Liu Q, Dong Q, Li F (2014) Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. *J Cell Physiol* 229: 887–897.
 37. Kageyama S, Isono T, Iwaki H, Wakabayashi Y, Okada Y, Kontani K, Yoshimura K, Terai A, Arai Y, Yoshiki T (2004) Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine. *Clin Chem* 50: 857–866.
 38. Kageyama S, Isono T, Matsuda S, Ushio Y, Satomura S, Terai A, Arai Y, Kawakita M, Okada Y, Yoshiki T (2009) Urinary calreticulin in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma. *Int J Urol* 16: 481–486.
 39. Vaksman O, Davidson B, Tropé C, Reich R (2013) Calreticulin expression is reduced in high-grade ovarian serous carcinoma effusions compared with primary tumors and solid metastases. *Hum Pathol* 44: 2677–2683.
 40. Chang HH, Lee H, Hu MK, Tsao PN, Juan HF, Huang MC, Shih YY, Wang BJ, Jeng YM, Chang CL, Huang SF, Tsay YG, Hsieh FJ, Lin KH, Hsu WM, Liao YF (2010) Notch1 expression predicts an unfavorable prognosis and serves as a therapeutic target of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 16: 4411–4420.
 41. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanese C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schönegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 369: 2379–2390.
 42. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du MQ, Greaves M, Bowen D, Huntly BJ, Harrison CN, Cross NC, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 369: 2391–2405.
 43. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144–1148.
 44. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779–1790.
 45. Sun C, Zhang S, Li J (2015) Calreticulin gene mutations in myeloproliferative neoplasms without Janus kinase 2 mutations. *Leuk Lymphoma* 56: 1593–1598.
 46. Nickenig G, Michaelsen F, Müller C, Berger A, Vogel T, Sachinidis A, Vetter H, Böhm M (2002) Destabilization of AT1 receptor mRNA by calreticulin. *Circ Res* 90: 53–58.

CRUCIBIOQ[®]

FUNCIONES DE LOS NUCLEÓTIDOS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@bq.unam.mx



HORIZONTALES

- 2** Para que la célula pueda realizar las reacciones biosintéticas, es necesario el acoplamiento a aquellas que al ser _____ desprenden energía libre, en muchas de ellas mediante la participación del ATP.
- 5** Debido a su composición a este grupo pertenecen el NAD⁺, el NADH, el NADP⁺, el NADPH, el FAD y el FADH₂.
- 7** Es una enfermedad en humanos ocasionada por el depósito de cristales de urato monosódico en el líquido sinovial de las articulaciones lo que ocasiona dolor e inflamación.

- 8** Algunos _____ sintéticos de bases nitrogenadas se usan como fármacos anticancerígenos como ejemplo: 6-tioguanina, 5-fluorouracilo, entre otros, ya que se incorporan al DNA antes de la división celular.
- 9** Hay dos, la que se llama a nivel de sustrato es independiente de la cadena de transporte de electrones y se realiza cuando un sustrato de alta energía la pierde, permitiendo la incorporación de un fosfato al ADP, un ejemplo es la formación de ATP a partir de fosfoenolpiruvato.
- 16** Nombre común de ribonucleótido 5' -difosfato que al aceptar un grupo fosfato más genera la molécula que la célula emplea para activar energéticamente a muchos de sus metabolitos.
- 18** Mecanismo mitocondrial de fosforilación en donde se concentra la mayor cantidad de energía en forma de ATP.
- 21** Algunas bases nitrogenadas como por ejemplo la 6-mercaptapurina, el 5-fluorouracilo, son análogas a las constitutivas de los ácidos nucleicos, tienen una función _____ ya que inhiben la síntesis del polinucleótido y con ello se impide la división celular tanto en los tejidos con información equívoca, como de aquellas que no la tienen.
- 22** Son las enzimas que hidrolizan los enlaces fosfodiéster interiores de los ácidos nucleicos.
- 25** Sustancia que en el proceso de transferencia electrónica impide que el ADP se fosfore, un ejemplo es el 2,4-dinitrofenol.
- 27** Estructura formada por una base nitrogenada que puede ser purina o pirimidina y una molécula de ribosa.
- 28** Los nucleótidos que tienen esta función, son en general, los trifosforilados y la coenzima A.
- 30** Este tipo de ácidos son polímeros con información genética, presentes en todos los organismos, sus unidades se asocian mediante enlaces fosfodiéster.
- 32** En este grupo de sustancias están la nicotinamida, la riboflavina, el ácido pantoténico, todos ellos forman parte de los nucleótidos con función coenzimática.
- 33** Estructura del grupo de las pirimidinas que en unión del azúcar correspondiente y de un grupo fosfato se encuentra presente tanto en el ácido ribonucleico como en el desoxirribonucleico.
- 34** Siglas de la molécula oxidada que en su forma reducida se obtiene en el ciclo de los fosfatos de hexosa y que es pieza fundamental para la síntesis de ácidos grasos y colesterol entre otras moléculas.
- 35** Base nitrogenada con estructura de purina, se encuentra presente en ambos ácidos nucleicos; la estructura trifosforilada interactúa con proteínas transductoras de señales en donde un estímulo desencadena una cascada de actividades enzimáticas.
- 36** Es la forma activa de la vitamina B₂, participa en la transferencia de partículas subatómicas que entran al sistema de transporte de electrones en el complejo II.

VERTICALES

- 1** Constituida por una base purínica y ribosa, se encuentra presente en un buen número de cofactores enzimáticos, aunque no participa directamente en la forma reactiva, posiblemente tenga relación con la energía de unión entre la enzima y el sustrato
- 3** Se les conoce como bases _____ a aquellas estructuras del tipo de purinas (adenina, guanina) y pirimidinas (citosina, timina, uracilo) que forman parte de los nucleótidos.
- 4** La _____ del ATP es un complejo enzimático que actúa en la membrana interna mitocondrial y permite la formación de la molécula con un $\Delta G^{0'} = -30.5$ kJoules/mol.
- 6** Nucleósido del grupo de las purinas, tiene un grupo amino en la posición 6 y forma parte del ácido desoxirribonucleico
- 10** En este espacio se encuentran todas las enzimas del metabolismo de las purinas, el primer paso está mediado por la fosforibosil pirofosfato sintetasa que permite la pirofosforilación de la D-ribosa 5 -fosfato con la intervención del ATP.
- 11** Molécula que en su composición tiene al sistema anular de corrina con el que está coordinado el cobalto -estructura que recuerda al grupo heme de la hemoglobina- las necesidades diarias en personas sanas son de 3 $\mu\text{g}/\text{día}$. La anemia perniciosa se debe a la incapacidad para absorberla eficientemente a nivel intestinal.
- 12** Dentro de este grupo quedan incluidos el DNA y el RNA ya que el grupo 5'-fosforilo de un mononucleótido se esterifica al 3'-OH de la pentosa de un segundo nucleótido y así sucesivamente.
- 13** Por el mecanismo de _____ de grupos y no por simple hidrólisis es la forma en la cual el ATP proporciona energía de una manera covalente.

- 14** Participan en tres funciones muy importantes para la célula: son subunidades de los ácidos nucleicos, algunos son transportadores de energía y otros son componentes de cofactores enzimáticos.
- 15** La _____ de los nucleótidos puede realizarse por dos posibles rutas, la *de novo* y la de la recuperación, en donde la primera se realiza con sus precursores metabólicos (aminoácidos, ribosa 5-fosfato, CO_2 y NH_3) y en la segunda con los nucleósidos provenientes de los ácidos nucleicos.
- 17** La pentosa presente en este tipo de estructuras es la 2-desoxi-D-ribosa y son constitutivos de la molécula encargada de la transmisión de la información genética.
- 19** Siglas del nucleótido que al donar un grupo fosfato, le permite ser un intermediario que acopla reacciones endergónicas y exergónicas.
- 20** Es la secuencia de tres nucleótidos presentes en el RNA de transferencia que se acoplan a otras tres del RNA mensajero para codificar a un aminoácido.
- 23** El cAMP actúa en el interior de las células como segundo _____, su formación a partir de la pérdida del pirofosfato del ATP, es estimulada por hormonas o por señales moleculares.
- 24** La conversión de esta molécula en glucosa es con la participación de la UDP-glucosa y de tres enzimas, si hay un defecto genético de alguna de ellas, puede ocasionar una enfermedad crítica en el recién nacido por cúmulo ya sea del sustrato original o por algunos de los intermediarios.
- 26** Estructura conocida como _____ A, participa en reacciones de transferencia de grupos acilo, está constituida por 3' -fosfoadenosina difosfato, ácido pantoténico y β -mercaptoetilamina, esta última molécula posee un grupo SH terminal.
- 29** Siglas de la riboflavina fosfato en su forma oxidada es coenzima de algunas enzimas que participan en procesos de oxido-reducción.
- 31** Nombre genérico de las enzimas que intervienen ya sea añadiendo o eliminando un grupo fosfato de nucleótidos y en ocasiones de nucleósidos; ejemplo de reacciones: $\text{ATP} + \text{AMP}$, fosfocreatina + ADP o bien, $\text{ATP} + \text{UDP}$.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Ileana Hernández- Reséndiz, Javier Belmont- Díaz y Sara Rodríguez- Enríquez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México D.F, México.

Correo E: ileana.resendiz@gmail.com

APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN INTEGRADA DE MICHAELIS-MENTEN PARA EL CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA CELOBIOSA DESHIDROGENASA EN PRESENCIA DE Fe^{3+}

La celulosa es un homopolisacárido estructural de la pared celular de las células vegetales. Los enlaces β -1,4- glucosídicos de la celulosa son muy estables y difíciles de hidrolizar. En la naturaleza existen celulasas que degradan esta estructura formando celobiosa. El radical hidroxilo, también puede catalizar la ruptura del enlace β -1,4- glucosídico, aunque de manera inespecífica. En los sistemas biológicos, el radical OH^{\bullet} se produce a partir de una reacción espontánea donde participa el Fe^{2+} y el H_2O_2 conocida como reacción de Fenton (1).

La celobiosa deshidrogenasa cataliza la oxidación de la celobiosa, en celobiosa- 1,5- lactona más un aceptor de electrones en estado reducido, posteriormente los electrones pueden

ser transferidos a un átomo de Fe^{3+} y reducirlo en Fe^{2+} . El Fe^{2+} producido durante este ciclo catalítico puede participar en la reacción de Fenton (Fig. 1).

Para determinar si la celobiosa deshidrogenasa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* tiene como función la reducción del Fe^{3+} , se analizó la actividad de esta enzima en un único ensayo, usando la ecuación integrada de Michaelis-Menten para calcular los parámetros cinéticos.

Debido a que la celobiosa deshidrogenasa es una proteína que se secreta únicamente cuando el hongo se encuentra en etapa de proliferación e invasión, su extracción y purificación representa gran dificultad y el rendimiento es escaso, por lo que Kremer y Wood en 1992 analizaron la actividad de esta enzima en un único ensayo, usando la ecuación integrada de Michaelis-Menten.

La actividad de la celobiosa deshidrogenasa se determinó espectrofotométricamente a 340 nm con acetato férrico en ausencia de O_2 , a 30° C y pH 4.

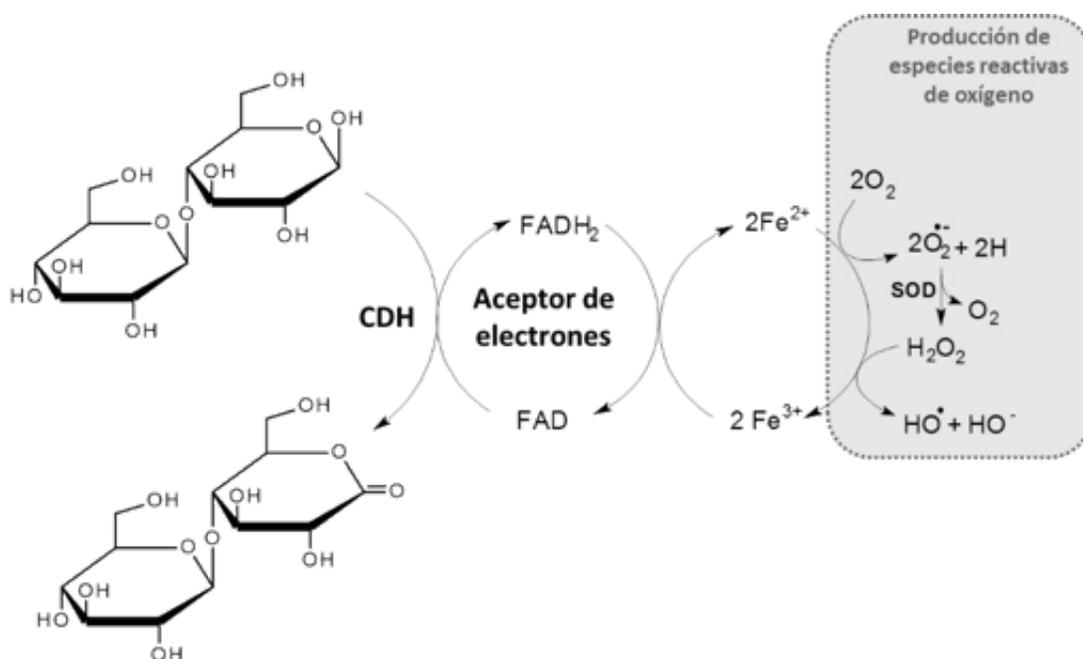


Figura 1. Modelo de reacción de la celobiosa deshidrogenasa.

TABLA 1. Actividad de la celobiosa deshidrogenasa con respecto al tiempo. Datos extraídos de Kremer y Wood (1).

Tiempo (min)	Abs (UA)
0	0.25
0.72	0.15
1	0.12
1.2	0.1
1.5	0.075
1.8	0.05
2	0.04
2.3	0.03
3	0.01

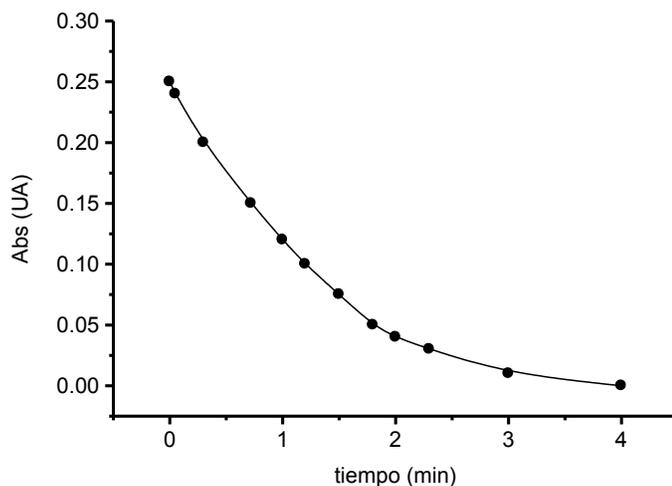


Figura 2. Perfil de reducción del Fe^{3+} con respecto al tiempo. La reacción se llevó a cabo en medio anaeróbico de acetato de sodio/ácido acético 100 mM, 30° C, pH 4 previamente burbujeado con argón por 20 minutos. Posteriormente se añadió celobiosa 1mM y 200 μ M acetato de Fe (II). La reacción enzimática se inició con la adición de 0.5 μ M de celobiosa deshidrogenasa. La absorbancia (Abs) fue monitoreada a 340 nm. [Tomado de Kremer and Wood (1).

El coeficiente de extinción para el Fe^{3+} es $\epsilon_{340} = 1.33 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los datos experimentales derivaron de la gráfica 1 del artículo de Kremer y Wood (1992) y se muestran a continuación en la tabla 1 y en la figura 2 (1).

Determinar:

a) K_s

b) V_{max}

c) Eficiencia catalítica (V_{max}/K_s)

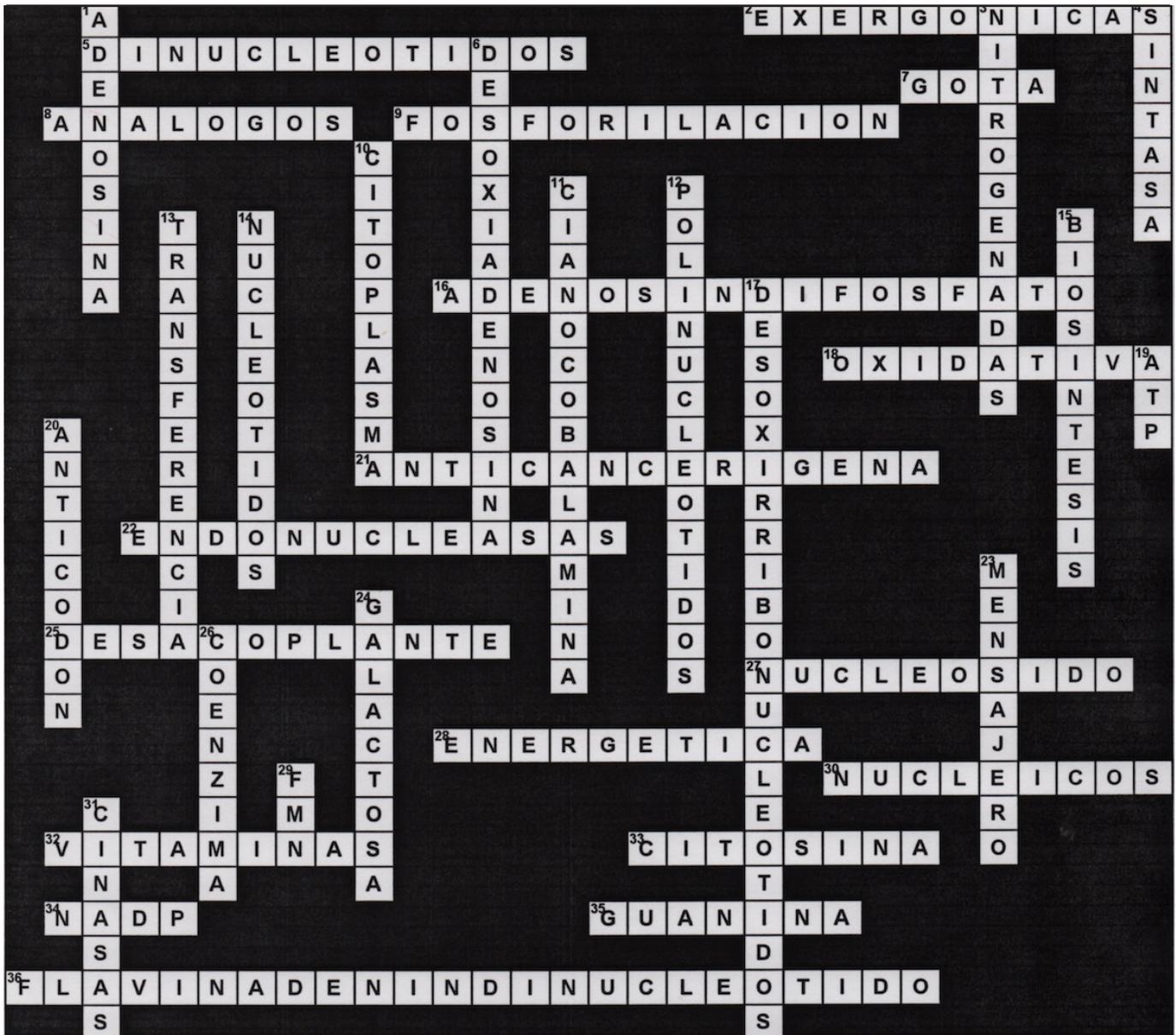
Nota: calcular los parámetros en μ M para la K_s y en μ M s^{-1} para la V_{max} .

REFERENCIAS

1. Kremer MS and Wood MP. Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(III) reductase. *Eur J Biochem.* 1992, 205: 133- 138.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ® FUNCIONES DE LOS NUCLEÓTIDOS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@bq.unam.mx



RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Ileana Hernández- Reséndiz, Javier Belmont- Díaz y Sara Rodríguez- Enríquez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México D.F, México.

Correo E: ileana.resendiz@gmail.com

APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN INTEGRADA DE MICHAELIS-MENTEN PARA EL CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA CELOBIOSA DESHIDROGENASA EN PRESENCIA DE Fe³⁺

Considerando el esquema general en el que se supone una saturación por sustrato y por lo tanto ausencia de reacción reversa:



De acuerdo con el esquema, se deduce la ecuación integrada de Michaelis-Menten para un sistema de una reacción irreversible en la que $K_s \ll K_p$ y el ΔG de la reacción es muy negativo.

Los parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de la ecuación integrada de Michaelis- Menten, la cual es una ecuación de velocidad diferencial que permite obtener un gráfico de tipo lineal (Fig. 3) basado en la ecuación original de Michaelis-Menten.

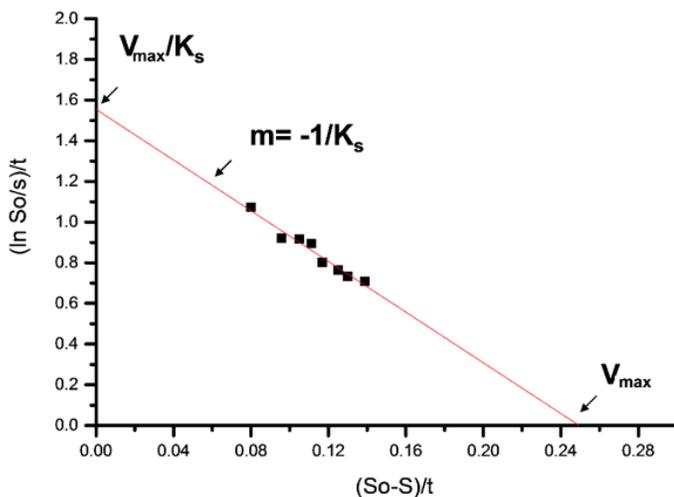


Figura 3. Linearización de los datos obtenidos con la ecuación integrada de Michaelis- Menten a partir de los datos de Kremer y Wood (1).

En la figura 2 se muestra el perfil de tiempo de la reducción del acetato de Fe³⁺ utilizando concentraciones de 50- 500 μM de acetato de Fe³⁺ a 30° C y pH 4.

La derivación de la ecuación asume que el decremento en velocidad en el tiempo resulta solo de la disminución de la saturación de la enzima y no de la inhibición por producto o a que la enzima ha llegado al equilibrio.

Cuando se llevan a cabo este tipo de experimentos, se toma en cuenta la desaparición del sustrato conforme al tiempo. Cabe mencionar que la ecuación integrada de Michaelis- Menten se utiliza únicamente cuando hay muy poca enzima, poco sustrato o cuando el método de medición presenta muchas dificultades.

DEDUCCIÓN DE LA ECUACIÓN

Para desarrollar la ecuación integrada de Michaelis-Menten se considera que la velocidad de una reacción catalizada puede ser expresada como el consumo de sustrato con respecto al tiempo (2) (Ec. 1).

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{V_{max} S}{K_s + S} \dots \dots (1)$$

La expresión (1) puede rearrreglarse para plantear la ecuación diferencial (Ec.2) y posteriormente integrarla (Ec. 3)

$$-\left(\frac{K_s + S}{S}\right) dS = V_{max} dt \dots \dots (2);$$

$$-K_s \int_{S_0}^S \frac{dS}{S} - \int_{S_0}^S dS = V_{max} \int_0^t dt \dots \dots (3)$$

Al resolver la integral obtenemos:

$$-Ks (\ln S - \ln S_0) - (S - S_0) = V_{max} t \dots \dots (4)$$

Dividiendo la ecuación (4) entre ($Km \cdot t$) y re- arreglando obtenemos la expresión final para la ecuación de Michaelis-Menten integrada:

$$\frac{\ln(S_0/S)}{t} = \frac{V_{max}}{Ks} - \frac{1}{Ks} \frac{(S_0 - S)}{t} \dots \dots (5)$$

A partir de los datos proporcionados se calcula $(S_0 - S)/t$ (x) y $(\ln S_0/S)/t$ (y) y se obtiene el gráfico (Tabla 2 y Fig. 3).

TABLA 2. Aplicación de la ecuación integral de Michaelis-Menten para la determinación de los parámetros cinéticos de la celobiosa deshidrogenasa.

T i e m p o (min)	Abs (UA)	(So-s)/t	(ln So / s)/t
0	0.25		
0.72	0.15	0.14	0.71
1	0.12	0.13	0.73
1.2	0.1	0.13	0.76
1.5	0.075	0.12	0.80
1.8	0.05	0.11	0.89
2	0.04	0.11	0.92
2.3	0.03	0.10	0.92
3	0.01	0.08	1.07

De acuerdo con la ecuación integrada de Michaelis- Menten, los interceptos en los ejes (y) y (x) permiten calcular la V_{max} y la eficiencia catalítica mediante la ecuación $Abs = abc$ ($a = 1.33 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

$b = 1 \text{ cm}$; $c =$ concentración), mientras que la pendiente proporciona la Ks de la enzima por el Fe^{3+} . La V_{max} fue de $2.2 \mu\text{M s}^{-1}$, la Ks fue de $66.5 \mu\text{M}$ y la eficiencia catalítica fue de 0.03 s^{-1} . (Lo reportado en el artículo: $V_{max} = 2.2 \pm 0.05 \mu\text{M s}^{-1}$ y $Ks = 54 \pm 3 \mu\text{M}$) (Fig. 3).

CONCLUSIONES

La ecuación integrada de Michaelis- Menten es una estrategia que se utiliza para la determinación de los parámetros cinéticos cuando (a) existe poco rendimiento de proteína; y (b) poco sustrato disponible. Cuando se utiliza la ecuación integrada de Michaelis- Menten se considera una $Ks \ll Kp$, ΔG muy negativa (enzima muy rápida donde prácticamente la reacción reversa no existe).

Se debe considerar que la aplicación de la ecuación de MM como se ilustra en este trabajo tiene como inconveniente, que la concentración de sustrato con respecto al tiempo ($[S]_t$) es una variable con alto grado de error experimental y su transformación lineal podría dar lugar a una errónea estimación de las Ks y V_{max} (3). Por lo anterior, se están desarrollando nuevos métodos matemáticos que resuelven la ecuación integrada de Michaelis-Menten con la finalidad de disminuir el error en el cálculo de los parámetros cinéticos (3-5).

REFERENCIAS

1. Kremer MS and Wood MP. Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(III) reductase. *Eur J Biochem.* 1992, 205: 133- 138.
2. Segel IH. *Enzymatic Kinetics.* John Wiley and Sons, New York. Cap. 2. pp 54-57.
3. Chetan T. Goudar et al. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999, 1429: 377-383.
4. Chetan T. Goudar et al. *J. Microbiological Methods.* 2004, 59: 317 - 326.
5. Marko Golcnik. *Analytical Biochemistry.* 2010, 406: 94-96.

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

La REB es una revista dedicada a la divulgación, difusión, discusión, análisis y presentación de resultados derivados de investigaciones originales en temas relevantes en el campo de la bioquímica y áreas afines. La Revista está dirigida a investigadores, profesores y estudiantes de posgrado, licenciatura y educación media superior. Los trabajos que se someten a evaluación para su posible publicación no deben de haberse presentado total o parcialmente en otras publicaciones.

Se aceptan únicamente contribuciones originales con estricto contenido científico en forma de artículos de investigación, de revisión, de crítica, de análisis y otras comunicaciones que tengan que ver con diversas formas de estimular el aprendizaje de la bioquímica y sirvan de apoyo a investigadores, profesores y alumnos, tanto en aspectos de investigación, académicos y de actualización.

I. Los artículos se deben ajustar a los siguientes lineamientos editoriales:

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 departamento, institución, ciudad, estado y 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) Resumen. Se deberán incluir dos resúmenes, uno en idioma español y uno en inglés (Abstract) de no más de 350 caracteres.

3) Palabras clave. Se deberá proporcionar de tres a seis palabras clave en idioma español y en inglés.

4) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima recomendada 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.

5) 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 para los artículos: 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, Ann Arbor, Michigan, USA, 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. 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 pueden presentarse en colores, con fondo y sombreado. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales y 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 después de la reducción. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse el crédito correspondiente y en su caso

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 y entre paréntesis (Fig. 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula y entre paréntesis (Tabla 2).

7) Abreviaturas. Las abreviaturas seguirán las normas de la IUPAC, aquellas específicas o poco comunes deberán definirse entre paréntesis, la primera vez que se utilicen.

II. Otras comunicaciones incluyen: resúmenes de artículos científicos interesantes, relevantes o significativos, información científica o académica de interés general, avisos de reuniones académicas y cursos, problemas teóricos, ejercicios prácticos, juegos didácticos con orientación educativa, bolsa de trabajo o comentarios de artículos publicados previamente en la REB, cartas al editor, entre otras. Éstas deberán seguir los siguientes lineamientos:

- 1) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 2) Se aceptará un máximo de 10 referencias que se citarán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrán incluir figuras o tablas, 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 lo menos por tres revisores seleccionados por el Comité Editorial a quienes se les enviará el trabajo con los autores en anónimo y quienes en todo momento permanecerán anónimos para los autores y entre

ellos; los revisores opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor a un mes. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas con anonimato entre ellos al Editor en Jefe. El resultado de la evaluación puede ser: rechazado, enviado para correcciones o aceptado. Una vez obtenida una evaluación global, el Editor en Jefe enviará las evaluaciones al autor responsable para que corrija e incorpore en el manuscrito las diferentes observaciones o en su caso, indique su opinión a observaciones que considere discutibles en los dictámenes de los revisores. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la Revista, en un lapso no mayor a 30 días naturales; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. De ser necesario el Comité Editorial podrá enviar nuevamente el manuscrito corregido a los revisores para tener una nueva ronda de revisión, todo ello continuando con el anonimato. 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 indicar plenamente su adscripción con teléfono, dirección electrónica y postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje enviado se deberá 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. En el mismo texto se debe de aclarar que el trabajo no ha sido enviado a otra revista en su forma total o parcial, para su evaluación o que el mismo está en proceso de publicación en otra revista o en otro tipo de publicación. De igual manera se debe de aclarar que no existe conflicto de intereses entre los autores que envían el trabajo.