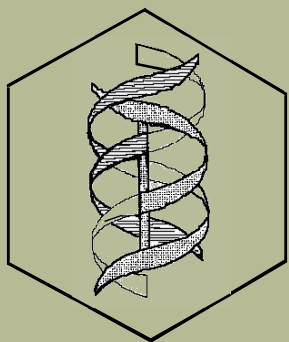


REB 2014

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. 33

No. 2

JUNIO 2014

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

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-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

AURELIO MENDOZA MEDELLÍN

Facultad de Medicina
Universidad Autónoma del Estado de México

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

- LA OBTENCIÓN DE SOBRETUROS DE LOS
TRABAJOS CIENTÍFICOS EN LA ERA DE LA
INFORMÁTICA
José Víctor Calderón Salinas.....37

ARTÍCULOS

- AVANCES RECIENTES EN EL ESTUDIO DEL
CICLO CELULAR EN PLANTAS
Sara Margarita Garza Aguilar,
Víctor Allan Sánchez Camargo,
Silvia Karina Godínez Palma y
Aurora Lara Núñez.....39
- EL USO DE LA ECUACIÓN DE HENDERSON-
HASSELBALCH PARA EL CÁLCULO DEL pH
EN SANGRE
Juan Pablo Pardo Vázquez y
Deyamira Matuz Mares.....48
- POLIAMINAS: PEQUEÑOS GIGANTES DE LA
REGULACIÓN METABÓLICA
Claudine Guasco Herrera,
Jorge Luis Chávez Servín,
Roberto Augusto Ferriz Martínez,
Karina de la Torre Carbot,
Elizabeth Elton Puente y
Teresa García Gasca.....51

OTRAS COMUNICACIONES

- CRUCIBIOQ
BASES QUÍMICAS PARA LA BIOQUÍMICA
Yolanda Saldaña Balmori.....58
- PROBLEMA BIOQUÍMICO
Elizabeth Lira Silva,
Ricardo Jasso Chávez y
Juan Pablo Pardo Vázquez.....62
- XXX CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA
Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.....66
- SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
BASES QUÍMICAS PARA LA BIOQUÍMICA
Yolanda Saldaña Balmori.....67
- SOLUCIÓN AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Elizabeth Lira Silva,
Ricardo Jasso Chávez y
Juan Pablo Pardo Vázquez.....68
- INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....73

EDITORIAL

LA OBTENCIÓN DE SOBRETIDOS DE LOS TRABAJOS CIENTÍFICOS EN LA ERA DE LA INFORMÁTICA

Hace unos días recordábamos aquellas épocas, tal vez no tan lejanas, cuando se tenían que revisar los libritos del "current contents", con una letra que apenas si se podía distinguir de tan pequeña; invirtiendo horas en recorrer una interminable cantidad de títulos, para después de localizar un artículo de interés ir a la sección de autores y localizar la dirección postal del autor de correspondencia, anotarla en tarjetas especiales, junto con las datos del sobre a solicitar, colocar un timbre y enviar por correo. El autor lo recibía y si aun tenia sobre, colocaba el correspondiente en un sobre, le colocaba timbres postales y lo enviaba por correo. Recibir el sobre era emocionante, abrirlo y encontrar el sobre, frecuente con una tarjeta del autor agradeciendo la solicitud o firmado y con el agradecimiento cercano al título del trabajo; no faltaba quien coleccionaba sobres, timbres y tarjetas. El sobre era celosamente guardado y se archivaba con cuidado, como si se tratara de un pequeño tesoro, el cual había tardado hasta dos meses en concretarse y llegar a las manos del interesado. El procedimiento en sí mismo era solidario y daba la idea de que se sabía quien leía los trabajos y hasta la sensación de tener un acercamiento muto, que se generaba con las tarjetas y los intercambios de agradecimiento, la firma con bolígrafo y los buenos deseos, aunque muchas veces, en realidad, lo hacían los asistentes de ambas partes.

Después de una descripción como la anterior varios alumnos que estaban en la plática se sonrieron, seguramente pensando en neardentales y dinosaurios, sin saber que esto ocurría todavía no hacía mucho tiempo, tal vez veinte años atrás. Es asombroso como ha cambiado este nostálgico pero engorroso procedimiento para conocer y tener la información científica generada en publicaciones, llevada al grado de ciencia ficción, gracias a la tecnología informática.

En la actualidad solo hay que teclear unas palabras en una página electrónica con un motor de búsqueda (buscador), que ni siquiera tiene que ser especializado, y solicitar que se localice

la información, ya sea por palabras clave, frases, autores, revistas, imágenes, presentaciones, entre muchas otras posibilidades. Si se conoce el título completo también este se puede ingresar y en segundos se arrojan una multitud incontable de resultados. También se puede agregar una frase y se encuentra los artículos con tales frases o similitudes. De esta manera un trabajo de investigación puede ser localizado en segundos, se puede ver el resumen y el trabajo completo, solicitarlo al autor o a la revista, grabarlo electrónicamente o imprimirlo, algunas veces con un costo, pero con una velocidad inimaginable en aquellos, no muy lejanos, años.

Antes se contaba con poca y discreta información, obtenida de los "current contents" arriba indicados o de la bibliografía contenida en los artículos que se habían logrado conseguir; ahora tenemos acceso a infinidad de artículos, algunos de ellos incluso antes de su publicación en papel.

El problema se centra ahora en cómo organizar toda esta información y discriminar que leer en este mar de posibilidades, problema que se hace más evidente y se desborda en los alumnos de posgrado, los cuales enfrentan serias dificultades para poder centrar las introducciones de su trabajo de tesis, su marco conceptual y su mapa mental, con tanta y tan diversa información sobre su tema de trabajo, lo cual sin las herramientas adecuadas y los criterios concretos puede llevarlo por caminos tortuosos de trabajo, lectura y escritura.

Lo anterior parecería una queja sobre la gran cantidad de información y el acceso a ella, que por supuesto nadie puede tener. La preocupación es como sistematizar, organizar y utilizar esa información. Para organizar y sistematizar las propias compañías editoras y los sistemas de indexación han desarrollado y ofrecen gratuitamente, programas para la búsqueda de trabajos relacionados, otros trabajos de los autores de interés y los factores de impacto de revista, artículos y autor. Con el sesgo de tener preferencia por las revistas asociadas o por los portales de autores cautivos a los que obligan a registrarse

en diferentes redes sociales que bombardean de propaganda, obteniendo de ahí su ganancia.

También estas agencias han desarrollado sub-páginas electrónicas, con nubes virtuales, donde se puede guardar información profesional, artículos revisados y propios, incluyendo la posibilidad de manejar la bibliografía para integrarla sistematizada a trabajos para publicación, tesis o cualquier documento que requiera el manejo de referencias. Acciones que rozan la ilegalidad de motivar al autora a colocar los trabajos de investigación electrónicos en una nube que se puede convertir en una especie de "open access" no autorizado por la revista y que puede resultar en sanciones legales-administrativas para el autor o para la institución a la que pertenece.

Todos estos instrumentos sin duda muy útiles y muy utilizados también nos van dando sesgos y generando directrices de los editores y administradores de las revistas de que leer, desde las calificaciones a los trabajos recibidos para poder o no publicarse, pero también las recomendaciones y las asociaciones de trabajos y autores con temas similares y las calificaciones a los propios artículos ya publicados. Lo cual aunado a la gran cantidad de información, obliga a los alumnos de posgrado a desarrollar criterios particulares de discriminación de búsqueda, lectura y uso de la información.

En tal sentido los directores de tesis, asesores y profesores de los cursos deben de tener especial

atención para que el alumno desarrolle estas competencias y pueda aprovechar las herramientas que las tecnologías de la información y la computación ofrecen y permiten invertir los recursos intelectuales y el tiempo en otros elementos de desarrollo y no en la tediosa búsqueda y obtención de bibliografía como ya se ha descrito.

Evidentemente en la generación de esos criterios se corre el riesgo de generar sesgos por las propias preferencias de los directores de tesis, asesores y profesores, que también tienen preferencias por autores, teorías, escuelas del pensamiento y revistas. Motivo por lo cual es conveniente que el alumno se exponga a diversos criterios para generar finalmente uno propio.

Es necesario que los profesores de posgrado meditemos sobre estos temas para poder generar ese marco conceptual y hacerlo evidente al alumno y generar en él la necesidad de adquirir esta competencia y aplicarla para la obtención adecuada de la información en esté mar de información, en el que ahora nadamos.

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

AVANCES RECIENTES EN EL ESTUDIO DEL CICLO CELULAR EN PLANTAS*

Sara Margarita Garza Aguilar¹, Víctor Allan Sánchez Camargo¹,
Silvia Karina Godínez Palma¹ y Aurora Lara Núñez²

¹Departamento de Bioquímica ²Departamento de Bioquímica de plantas.
Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito de la Investigación. Edificio E, Facultad de
Química. Ciudad Universitaria. Col. Copilco el Alto. C.P. 04510. México D.F. México. Correo E: auroraln@unam.mx

RESUMEN

El ciclo celular, cuyo fin es la generación de células genéticamente idénticas, comprende 4 fases: G1, S, G2 y M. Durante este proceso se presentan tres puntos principales de control que se llevan a cabo en las transiciones G1/S, G2/M y en la mitosis (metafase/anafase). En estos puntos cruciales participan un conjunto de proteínas que controlan la progresión correcta del ciclo celular. Entre ellas, se encuentran varios tipos de reguladores, por ejemplo en plantas las ciclinas tipo D (CYCD) que son las que perciben las condiciones externas e internas de la célula y son muy sensibles a fitohormonas y nutrientes. También existen las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus respectivos inhibidores como, las proteínas KRPs. Otro tipo de proteínas son los factores transcripcionales E2F, la familia de las RBRs y la proteína PCNA, entre otras. Las plantas se distinguen por codificar en su genoma un mayor número de integrantes de cada una de estas familias de proteínas, en comparación con los mamíferos.

PALABRAS

CLAVE:

Ciclo celular,
Ciclinas, CDK,
E2F, RBR,
Fitohormonas.

ABSTRACT

The cell cycle consists of four phases: G1, S, G2 and M, and has the purpose of generating genetically identical daughter cells. There are three major control points during the cell cycle, between G1/S, G2/M and in mitosis (metaphase/anaphase). On these checkpoints, protein families participate controlling the correct cell cycle progression. These include cyclins (CYC) of various types, being CYCDs the sensors of environmental and internal conditions of the cell (i.e., phytohormones and nutrient status), cyclin-dependent kinases (CDKs) and their inhibitors like KRP proteins, the E2F transcription factor group, the RBR family of proteins and PCNA, among others. Plant genomes encode larger cell cycle protein families than those found in mammals.

KEY WORDS:

Cell cycle,
Cyclins, CDK,
E2F, RBR,
Phytohormones.

INTRODUCCIÓN

El ciclo celular es una serie de eventos moleculares secuenciales y unidireccionales cuya función es la duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) para generar dos células hijas, cada una con una copia idéntica de material genético. Los pasos secuenciales que comprende el ciclo celular son cuatro: una fase en la que la célula se asegura de que existen las condiciones idóneas para poder dividirse, denominada Gap1 (G1); una fase de repli-

cación de ADN nuclear, Fase S (S); otra fase donde se verifica que la duplicación de ADN se realizó de manera completa y sin errores, denominada Gap2 (G2); y finalmente, una fase de segregación de las cromátidas (Fase M o mitosis) (Fig. 1). La mitosis, a su vez, se lleva a cabo en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase/citocinesis. Durante la profase ocurre la ruptura de la membrana nuclear y la condensación de cromatina para formar los cromosomas (cromátidas hermanas unidas por el centrómero). En la metafase, los cromosomas se

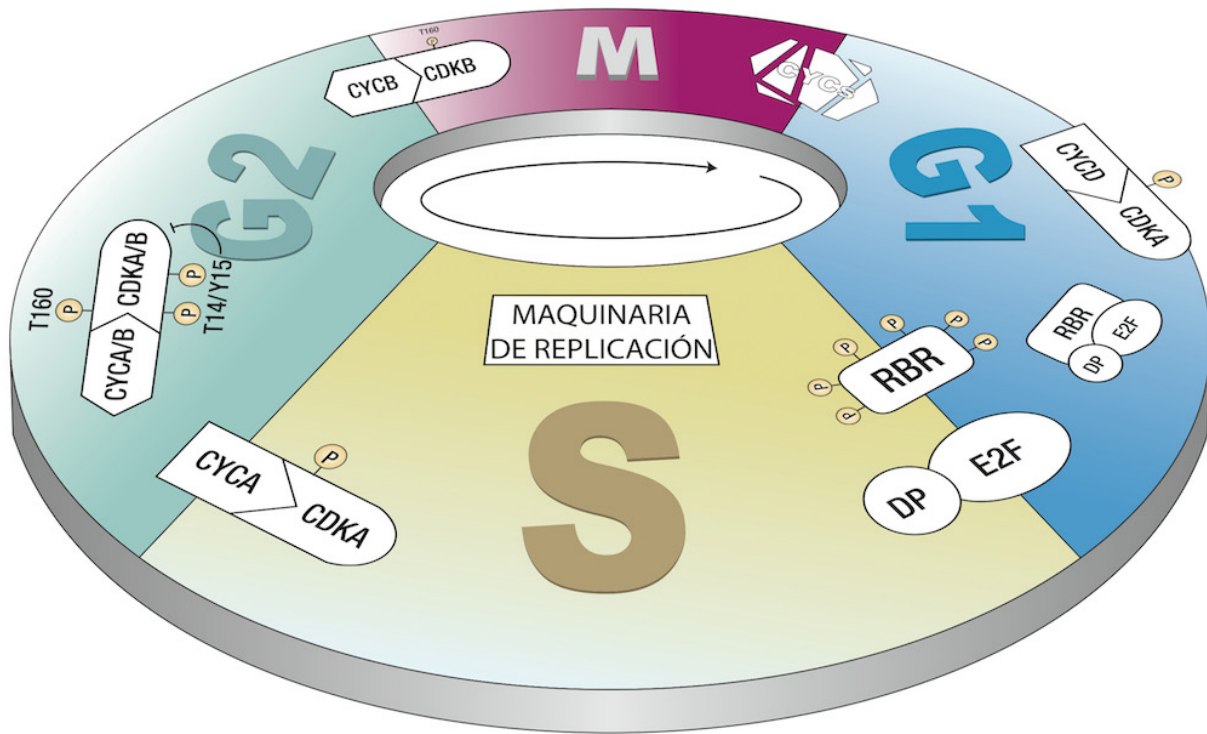


Figura 1. Esquema general de las fases del ciclo celular y principales componentes que participan en cada una de ellas. Los complejos CYCD/CDKA fosforilan a la proteína RBR en la transición G1/S, liberando al factor transcripcional E2F/DP, lo que a su vez permite la transcripción de un conjunto de actores encargados de conducir la progresión del ciclo celular. En S así como en G2 se establecen diversos complejos de CYCA/B con CDKA/B, mientras que en M sólo se han observado complejos CYCB/CDKB. Para que el ciclo funcione correctamente las ciclinas son degradadas y sintetizadas de novo al iniciar un nuevo ciclo.

localizan en el plano ecuatorial de la célula mediante el huso mitótico. En la anafase las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos de la célula. Finalmente, en la telofase, las dos nuevas envolturas nucleares rodean a cada juego de los cromosomas separados, éstos se descondensan y expanden en el nuevo núcleo generando dos células hijas mediante un proceso denominado citocinesis.

A lo largo del ciclo celular existen diversos puntos de control, los principales se presentan en las transiciones G1/S, G2/M y en la metafase/anafase de la mitosis. Durante la fase G1 la célula percibe las condiciones externas e internas (fitohormonas y nutrientes) activando mecanismos de señalización. Éstos desencadenan respuestas bioquímicas que marcan el inicio del ciclo celular. En la fase G2, la célula se asegura de que la replicación de ADN ha sido correcta, activándose la reparación de ser necesario, para poder continuar con la mitosis. Durante la mitosis, en la transición de metafase a anafase, la célula verifica que todos los cromosomas estén unidos correctamente a los microtúbulos del huso mitótico y estén alineados en el plano ecuatorial de la célula, para que posteriormente se lleve a

cabo la separación de las cromátidas hermanas y la formación de dos células genéticamente idénticas (1).

Entre eucariontes se conservan, de forma general, los mismos mecanismos moleculares de regulación del ciclo celular, incluyendo a las plantas, esto sugiere que su origen sucedió desde antes de la separación de estos taxones. Sin embargo, los genomas vegetales codifican para un mayor número de genes, lo que origina una mayor cantidad de proteínas del ciclo celular. Esto genera una alta complejidad, tanto en asociaciones como en mecanismos de regulación. Algunos de estos genes y proteínas son únicos en plantas, reflejando así la alta plasticidad que las especies vegetales requieren para enfrentarse a un estilo de vida sésil (Tabla 1).

Desde un punto de vista holístico, la maquinaria básica encargada del progreso y regulación del ciclo celular está conformada por proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que, junto con diferentes ciclinas (CYC), forman complejos heterodiméricos CYC/CDK encargados de fosforilar una gran variedad de proteínas blanco en los puntos de control G1/S, G2/M y en mitosis (1).

TABLA I

Número de genes relacionados con el ciclo celular que pertenecen a cada familia génica en diferentes organismos.

Genes	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (levadura)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura)	Mamíferos	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	<i>Zea mays</i> (Maíz)	Descripción
<i>Cdc2/CdkA</i>	1 (<i>cdc2</i> ^Φ)	1 (<i>cdc28</i> ^Φ)	2 (<i>cdk1</i> y <i>cdk2</i>)	1	3	3	Cinasas de serina y treonina caracterizadas por la secuencia PSTAIRE en el motivo de unión a ciclina.
<i>CdkB</i>	NH	NH	NH	4	2	3	Cinasas de serina y treonina, únicas de plantas, caracterizadas por la secuencia PPTALRE/PPTTLRE.
<i>CycA</i>	NH	2	2	10	7	11	Ciclina que forman complejos con CDKs durante fase S y en la transición G2/M.
<i>CycB</i>	1	4	3	11	7	10	Ciclina que forman complejos con CDKs durante las transiciones G2/M e intramitóticas.
<i>CycD</i>	2	3	3	10	14	17	Ciclina de G1 cuya transcripción es activada por señales extracelulares.
<i>RB/RBR</i>	NH	NH	3	1	2	4	Proteína que actúa como represor transcripcional de E2F durante la transición G1/S.
<i>E2F</i>	NH	NH	8	3	5	1*	Factores de transcripción que activan genes de ciclo celular durante la transición G1/S, principalmente.
<i>DP</i>	NH	NH	3	2	3	1*	Socio de dimerización de E2F.
<i>ICK/KRP</i>	1	3	7 (4 <i>INK</i> ^Φ y 3 <i>ICK</i> ^Φ)	7	6	2*	Familia de proteínas inhibidoras de complejos CYC/CDK.
<i>PCNA</i>	1	1	1	2	1	2	Proteína de unión a ADN que se asocia a complejos CYCD/CDK.

*Resultados no publicados sugieren la presencia de más genes en estas familias; Φ, Nombre del homólogo en la especie; NH, no existen homólogos.

CDKs Y CICLINAS

El avance del ciclo celular es orquestado por la actividad de los complejos CYC/CDKs, los cuales pueden ser regulados a diferentes niveles como: la expresión de sus genes, síntesis y degradación proteica, modificaciones post-traduccionales, localización de los complejos, así como la interacción con otras proteínas (Fig 2).

Las CDKs son proteínas cinasas de serina y treonina que en plantas, se clasifican en 8 grupos de acuerdo al motivo de unión a la ciclina: de CDKA a CDKG y CDKL. El papel de las CDKs tipo A y B es el más estudiado en el ciclo celular de las especies vegetales. El grupo de CDKAs se caracteriza por presentar un motivo canónico de unión a ciclina, altamente conservado de 7 aminoácidos; este motivo se conoce como PSTAIRE, y estructuralmente, es homólogo a las proteínas cinasas cdk/p34cdc2 de mamíferos y levaduras, respectivamente (2). En estudios del ciclo celular de distintas especies vegetales, los niveles de CDKAs tanto de transcrito y proteína son constantes en todas las fases del ciclo celular, sugiriendo una función dual de la proteína: tanto en la progresión de la fase S como en el paso a la mitosis, lo que indica que las CDKAs tienen un papel preponderante en la proliferación celular durante el desarrollo de la planta (2).

Las CDKs tipo B son el segundo grupo de CDKs con más representantes en el reino vegetal, carecen de homólogos en levaduras y mamíferos, y poseen un motivo de unión a ciclina divergente, PPTALRE para CDKB1 o PPTTLRE para CDKB2. Durante el ciclo celular de distintas especies vegetales, los transcritos de *CDKB* muestran un pico de expresión en G2/M. Estas proteínas cinasas son capaces de unirse a las ciclina tipo A o B (2). No obstante, también se ha documentado la interacción de ciclina tipo D con CDKB. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, la CDKB interacciona con la Ciclina D4;1 y en *Nicotiana tabacum*, la CDKB1;1 interacciona con Ciclina D3;1 (3).

En general, el estado de fosforilación de las CDKs es fundamental para la funcionalidad del complejo. Su activación está determinada por la fosforilación de un residuo de treonina conservado en la zona central de la proteína (canónicamente treonina 160), mientras que la inhibición se da por la fosforilación de un residuo de treonina o de un residuo de tirosina en la región amino terminal (canónicamente la treonina 14 y la tirosina 15).

La reciente secuenciación de genomas de algunas especies vegetales, como los de *Arabidopsis*, arroz y maíz, entre otros, ha facilitado el estudio de los genes involucrados en el ciclo celular. Se ha encontrado un mayor número de genes relaciona-

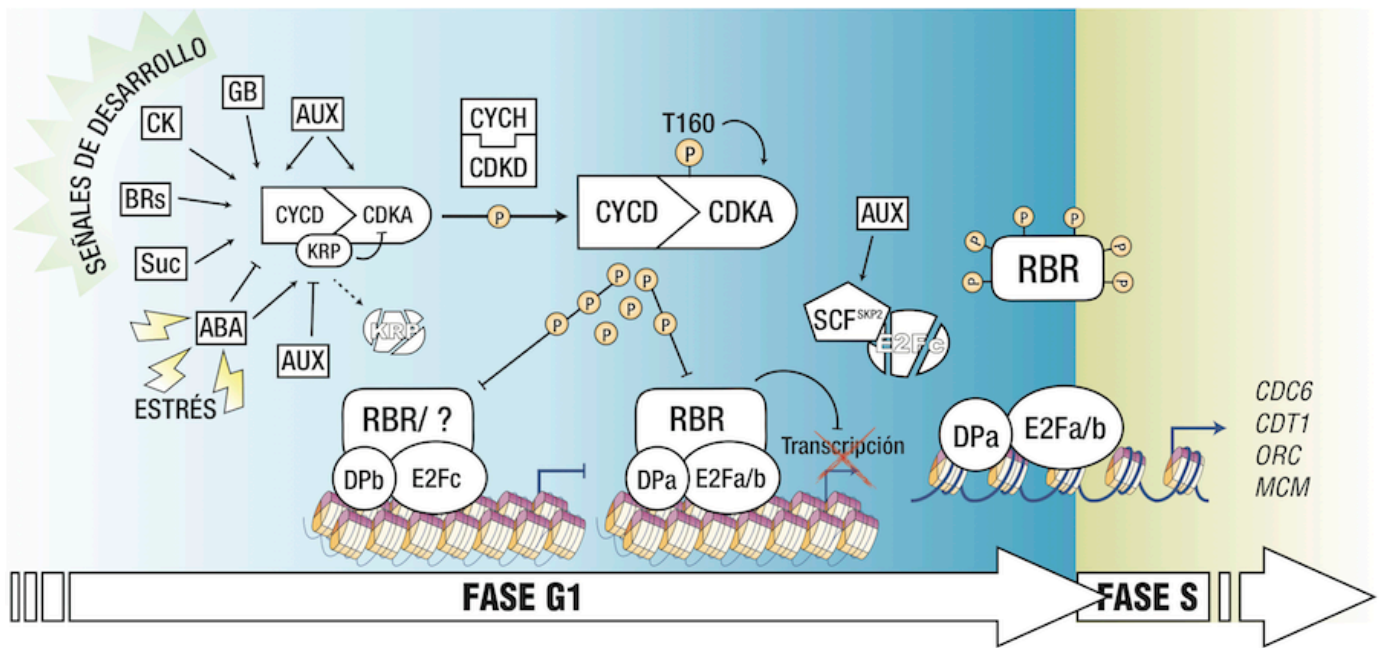


Figura 2. Regulación de la transición G1/S del ciclo celular en plantas. Los transcritos y proteínas de ciclinas y CDKs se acumulan durante G1 en respuesta a fitohormonas y nutrientes así como a la velocidad de crecimiento o el tamaño celular. Conforme avanza esta fase se forman los complejos CYCD/CDKA y son activados. En G1 tardía, RBR, la cual se encuentra reprimiendo al factor transcripcional E2F, es hiperfosforilada por CYCD/CDKA, ocasionando la pérdida de afinidad por el factor transcripcional E2F, se disocia de este, y permite la activación de genes necesarios para el establecimiento y avance de la fase S.

dos a este proceso en especies vegetales que en levaduras y mamíferos (Tabla 1), lo que sugiere una mayor complejidad en la regulación del ciclo celular. Así, en plantas se han identificado más de 100 genes de ciclinas diferentes. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se encontraron 50 posibles ciclinas de diferentes tipos, que se pueden agrupar en 12 clases, de las cuales 6 no cuentan con representantes homólogos en otros eucariontes. En general, se han identificado en plantas cinco clases de ciclinas de acuerdo con su similitud con las de mamíferos: A, B, C, H y L, y siete clases exclusivas de plantas: CYL, SDS, D, Q, T, P y F. Las más estudiadas en relación al ciclo celular son las tipo A, B y D.

Si se elimina la expresión de una sola ciclina no ocasiona cambios en el fenotipo. Es necesaria la disminución en la expresión de varias ciclinas del mismo tipo para que un cambio sea evidente, lo que apoya que algunas puedan presentar funciones redundantes.

Las ciclinas son proteínas típicamente inestables, con un alto número de recambio y vida media corta, ya que algunas poseen una caja de destrucción, y un motivo denominado PEST, que las marca para ser degradadas por el proteasoma 26S (complejo multiproteico nuclear y citoplásmico cuya función es la degradación específica de proteínas marcadas)

y por lo tanto les confiere inestabilidad.

El avance del ciclo celular continuo e irreversible, está regido por la síntesis y destrucción regulada de las ciclinas (2). Dado que las ciclinas son las unidades reguladoras de las CDKs, son las que determinan la especificidad por el blanco del complejo, fluctuando a lo largo del ciclo celular.

Las ciclinas tipo A y B comparten un alto porcentaje de identidad, incluyendo una secuencia central característica, llamada caja de ciclina, requerida para la unión con CDKs y una secuencia denominada caja de destrucción, similar a la reportada en mamíferos (Fig. 3). Se ha propuesto que la función de estas proteínas es predominante durante las fases S y G2/M. Su degradación durante la mitosis en mamíferos es esencial para un final exitoso del ciclo celular (2).

Las ciclinas tipo A pueden interaccionar con CDKA y CDKB, actuando en la fase S y en la transición G2/M; las ciclinas tipo B controlan la progresión del ciclo celular durante la mitosis, y se asocian con CDKBs (Tabla 1) (4).

Las ciclinas tipo D de plantas, así como las de mamíferos y levaduras son fundamentales en el inicio o re-inicio del ciclo celular por su respuesta a señales externas tales como fitohormonas, tipo y concentración de azúcares, y a señales internas

como puede ser la velocidad de crecimiento o el tamaño de la célula (Fig. 2). Estructuralmente las ciclinas D contienen una región conservada de 250 aminoácidos denominada caja de ciclina que consiste de dos dominios: el N-terminal que comprende una región de unos 100 residuos de aminoácidos conservados (caja de ciclina), y el C-terminal, menos conservado y a veces ausente en algunas ciclinas. Además, casi todas presentan el motivo conservado LxCxE (donde x representa cualquier residuo de aminoácido) cercano al extremo amino terminal. Este motivo es importante para la interacción de las ciclinas con la proteína RBR (en plantas).

En plantas, las ciclinas tipo D median el primer punto de control del ciclo celular en la transición G1/S al regular la fosforilación de la proteína RBR en complejos con CDKAs. Sin embargo, poco se sabe de los complejos CYCD/CDK y su función en el ciclo celular (1).

INTERACTOMAS

Para el estudio de las interacciones proteicas que se presentan en distintos momentos del ciclo celular, se han empleado principalmente tres estrategias: sistemas de doble híbrido, complementación bimolecular de la fluorescencia y purificación por afinidad en tándem.

La información generada con estas metodologías

ha permitido que en las últimas dos décadas se haya dilucidado la composición de los complejos CYC/CDKs, así como algunos aspectos de su regulación. Evidencias experimentales indican que estos complejos son parte clave en el control del ciclo celular, al menos en *Arabidopsis*, especie vegetal en la que más se ha estudiado este proceso. Entre los mecanismos de control predomina la asociación con inhibidores de CDKs, cinasas de CDKs y fosfatasa, la proteólisis dependiente de proteasoma 26S y el tráfico intracelular (5).

Por ejemplo, se demostró la interacción de CDKA con ciclinas tipo D durante la transición G1/S, y la interacción de CDKA con ciclinas tipo A3 en la progresión de la fase S. Así mismo, ha sido posible establecer interacciones del complejo CYCD/CDKA con inhibidores de CDK (KRPs), y la interacción de este complejo con diferentes miembros de la ruta E2F/DP/RBR. También se ha descrito que las ciclinas tipo B y tipo A2 de *Arabidopsis* presentan un pico de expresión en la transición G2/M (4,6) y forman complejos con CDKBs, regulando así la entrada a la fase M y la progresión de ésta.

PROTEÍNAS DE CICLO CELULAR EN MAÍZ

Se sabe que los eventos relacionados al ciclo celular en *Arabidopsis* marcan la pauta para extrapolar y comprender cómo se lleva a cabo el control del ciclo celular en otras plantas, sin embargo, también

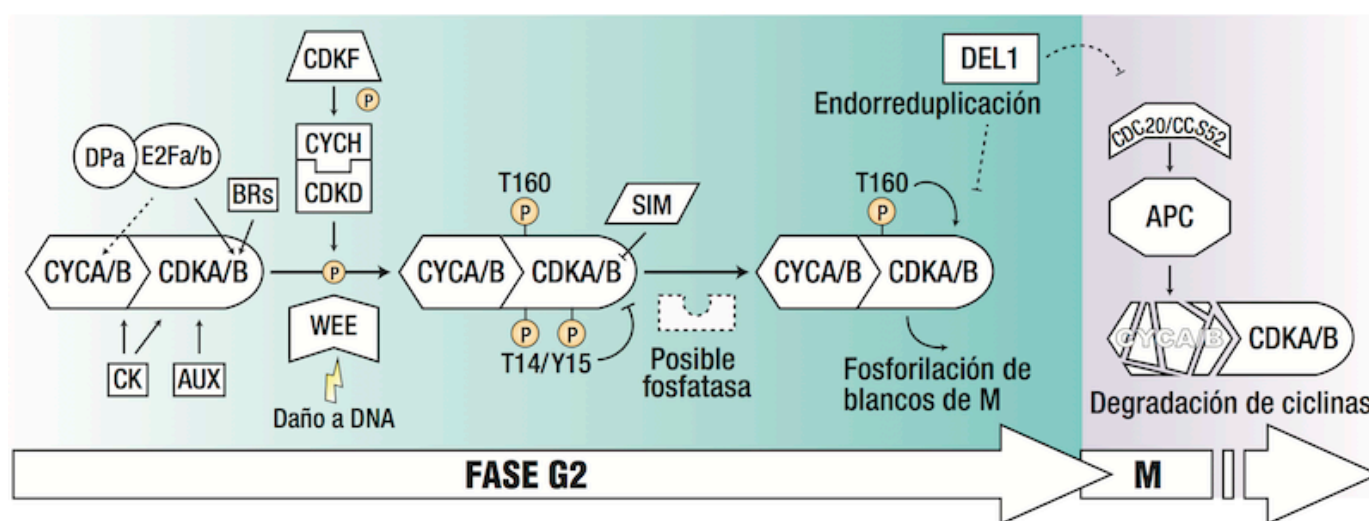


Figura 3. Principales reguladores de la transición G2/M y M. Durante la fase G2 los complejos CYC/CDK son regulados negativamente por asociación de las proteínas SIAMESE y por fosforilaciones. Como respuesta a algunos tipos de estrés, como daño al ADN o errores ocurridos durante la replicación, la cinasa WEE inactiva a CDK fosforilándola en las posiciones T14/Y15. Una vez reparados dichos errores, las fosforilaciones inhibitoras son removidas y la CDK es activada por cinasas activadoras de CDKs, mediante fosforilación en el residuo T160. Los complejos CYCB/CDKB activos fosforilan a sus blancos para el avance hacia mitosis. Durante metafase, las proteínas CDC20 y CCS52 activan al complejo promotor de anafase (APC), el cual forma parte del proteasoma 26S y dirige la degradación de ciclinas, permitiendo así la salida de mitosis.

se han realizado ensayos en arroz, tabaco y otras especies que indican que cada especie vegetal puede tener sus particularidades. El estudio del ciclo celular, en el caso particular del maíz, se facilitó considerablemente desde el año 2009, cuando se reportó la secuencia del genoma completo de esta especie. El análisis bioinformático en busca de genes homólogos relacionados filogenéticamente con ciclinas de *Arabidopsis* y arroz, en el genoma de maíz, arrojó al menos once posibles genes que codifican para ciclinas tipo A, diez para ciclinas tipo B y al menos diecisiete que codifican para ciclinas tipo D (Tabla 1). El estudio de la expresión de estos últimos durante la germinación de maíz y en tejidos de plántula (raíz, hoja y mesocotilo) mostró que 15 de ellos se expresan diferencialmente. En la zona meristemática de la raíz (grupo de células toti-potenciales y en división activa), las ciclinas D presentan niveles altos de expresión, con excepción de *CYCD3;1a*, lo que sugiere que esta ciclina podría presentar funciones específicas diferentes a las de otras ciclinas y, probablemente, estaría participando en procesos de desarrollo como diferenciación o endoreduplicación (tipo de ciclo celular alterno que evita el paso por mitosis y por lo tanto la célula aumenta su ploidía) (7). En maíz, también se han identificado tres genes que codifican para proteínas CDKA y tres para CDKB. La proteína CDKA presenta un patrón constante durante las primeras 24 horas de germinación, lo que indica su participación en diferentes puntos del control del ciclo celular.

OTRAS PROTEÍNAS REGULADORAS EN EL CICLO CELULAR

PCNA

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína que inicialmente se identificó en sueros de pacientes con lupus eritematoso, una enfermedad autoinmune; después fue descrita como una proteína esencial durante la replicación del ADN. Actualmente, se sabe que la replicación no es su única función en el ciclo celular, ya que juega un papel importante en otros procesos del metabolismo del ADN, como en reparación y remodelación de la cromatina. El análisis de PCNAs de diferentes especies (mamíferos, insectos y plantas) mostró que es una proteína altamente conservada a nivel de secuencia, estructura y función (8), que interacciona con proteínas clave del ciclo celular como son las ciclinas D y CDKs.

En maíz, durante las primeras horas de germinación, PCNA se acumula, presentando una abundancia proteica basal en semilla seca y una acumulación entre las 18 y 20 horas, lo que coincide

con el tiempo en que tiene lugar la replicación de ADN en células meristemáticas (9), lo cual sugiere que estas células se encuentran principalmente en fase S.

RBR

La proteína retinoblastoma o RB (pRB) fue descubierta por la identificación de mutaciones en diferentes posiciones de ambos alelos de un gen en tumores de retina, esto dio nombre a su producto. Posteriormente, la proteína fue descrita como una proteína supresora de tumores al regular los procesos de proliferación. En plantas la vía E2F/RB se encuentra conservada, y el homólogo de pRB es conocido como proteína relacionada a RB (RBR). Esta proteína reprime la actividad de los factores de transcripción E2F/DP durante G1 y es fosforilada por los complejos CYC/CDKs para permitir el avance hacia fase S. Además de participar en el ciclo celular de plantas, así como en el de mamíferos, también tiene una función reguladora en los procesos de diferenciación y desarrollo (10).

De acuerdo con estudios filogenéticos, funcionales y de expresión de genes, la familia de genes *RBR* de cereales es más compleja que la de otras plantas. En gramíneas existen al menos dos clases de genes *RBR*: *RBR1* y *RBR3*. En el genoma de maíz se han identificado otros dos parálogos (genes producto de duplicaciones genómicas en la misma especie) de *RBR1* y *RBR3*, más parecidos a *RBR2* y *RBR4*, respectivamente. El estudio de los dos tipos de proteínas RBR de maíz muestra que éstas se acumulan en distintas etapas de desarrollo. Por ejemplo, la proteína RBR3 participa en proliferación celular y la proteína RBR1 en procesos de diferenciación y endoreduplicación (11). Lo anterior podría sugerir que existe división de funciones, donde RBR3 participa en el control del ciclo celular y RBR1 en el control del desarrollo.

INHIBIDORES DE COMPLEJOS CYC/CDKs

Las proteínas relacionadas a KIP/CIP o KRPs, son inhibidores de la actividad de los complejos CYC/CDKs en plantas, pero también participan en el importe nuclear de otras proteínas del ciclo celular. Esta familia de proteínas ha sido aislada en especies de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. La sobreexpresión de miembros de KRP en *Arabidopsis* muestra fenotipos característicos de represión del ciclo celular como la reducción del tamaño de las plantas, disminución del número de células y células alargadas, indicando que las KRPs inhiben el ciclo celular, probablemente, tanto a nivel de las transiciones G1/S como de las G2/M (12).

En *Arabidopsis* se han descrito 7 genes que codifican para KRPs y en estudios del interactoma se reportó que estas proteínas co-purifican específicamente con ciclinas tipo D y CDKA1;1, sugiriendo que sólo inhiben a este tipo de complejos. En maíz, se observó que inhiben también la actividad de cinasa de complejos de CDKA con ciclinas tipo A y D. Otra familia de inhibidores menos caracterizados, específicos de plantas, son las proteínas *SIAMESE* (SIM) y las relacionadas a *SIAMESE* (SMR), que se han identificado en arroz, maíz, tomate y *Arabidopsis*, entre otras. Recientemente en el interactoma de *Arabidopsis* se observó que se unen a complejos de CDKA y CDKB; sugiriendo que pueden inhibir la actividad de ambas cinasas.

FAMILIA E2F/DP

Las proteínas E2F y sus socios de dimerización, las proteínas DP conforman heterodímeros que funcionan como factores transcripcionales. Los primeros estudios de la familia E2F/DP se enfocaron en entender su influencia sobre la expresión de múltiples genes requeridos para la entrada y progresión de la fase S del ciclo celular. Entre estos genes se encontraron los involucrados con la maquinaria de replicación y del metabolismo de ADN. También están involucrados en la regulación de la expresión de genes que participan en procesos biológicos como mitosis, respuesta al daño y reparación del ADN, diferenciación, desarrollo y muerte celular programada. La actividad transcripcional de E2F se modula a través de distintos mecanismos en células de mamíferos, el más conocido es a través de la interacción con pRB y otros miembros de su familia, como son p107 y p130. Al unirse pRB al heterodímero E2F/DP se reduce por impedimento estérico la interacción con proteínas co-activadoras de sus genes blanco. Tanto en animales como en plantas, la familia de E2F/DP está compuesta por tres grupos de proteínas: E2F, DEL (del inglés DP/E2F-Like protein) y DP, clasificadas por el tipo y número de dominios de unión a ADN. Las proteínas E2F y DP necesitan heterodimerizar entre ellas para unirse con alta afinidad al ADN, mientras que los miembros del grupo DEL se unen como monómero.

Las proteínas de la familia E2F/DP pueden presentar propiedades tanto de activación transcripcional como de represión. Así, en *Arabidopsis* la sobreexpresión simultánea de los activadores E2Fa y DPa en tejidos diferenciados con índices mitóticos muy bajos o nulos, promueve la reentrada al ciclo celular, y la consecuente proliferación celular mediante la activación de genes de fase S. Por otro lado, la sobreexpresión del represor E2Fc reduce la tasa de división celular y aumenta la endorre-

uplicación. Finalmente, se ha sugerido que los miembros tipo DEL funcionan como represores por competencia, ya que son capaces de reconocer la misma secuencia en el ADN que el heterodímero E2F/DP, pudiendo así, competir por ocupar los mismos promotores (12).

MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR DE PLANTAS

Los mecanismos moleculares que regulan el ciclo celular en especies vegetales no se han caracterizado completamente, además de que cada especie presenta características específicas, sin embargo, con los conocimientos adquiridos se pueden inferir algunos de estos.

El ciclo celular comienza cuando las señales extracelulares activan la transcripción de genes de ciclinas D durante la fase G1 temprana y al acumularse la proteína se forman complejos CYCD/CDK; estos complejos proteicos son regulados negativamente por las proteínas inhibidoras KRPs. Una vez que son liberados de esta represión, se activan por fosforilación de la treonina 160 de la CDK. Dicha fosforilación es catalizada por cinasas activadoras de CDKs (CAK), como CDKDo CDKF (Fig 2).

En la fase G1 tardía, el complejo activo CYCD/CDK fosforila a la proteína RBR, que reprime la actividad de la familia de factores transcripcionales E2F/DP. Una vez fosforilada RBR en múltiples sitios, pierde afinidad y se disocia del complejo E2F-DP permitiendo la transcripción de sus genes blanco, necesarios para el establecimiento y progresión de la fase S, como son los genes de establecimiento de origen (*ORCs*, *MCMs*, *CDT1*), de la maquinaria de replicación (*PCNA*, *DNApol*, entre otros) y de la progresión del ciclo celular (*Ciclina A*) (1, 2 y 12).

Durante la transición G2/M (Fig 3) se lleva a cabo la transcripción de los genes de *CYCA* y *CYCB* dependiente de E2F, en respuesta a una señalización provocada por hormonas. Los complejos *CYCA/B* con *CDKA/B* son regulados negativamente por proteínas inhibidoras del tipo *SIAMESE* (SIM) o KRPs y por fosforilaciones inhibidoras en la CDK (catalizadas por la cinasa *WEE*). Una vez reparados los posibles errores ocurridos durante la replicación, las fosforilaciones inhibitorias T14/Y15 son removidas por una fosfatasa putativa aún desconocida en plantas, pero ya identificada y estudiada en otros organismos. Similar a lo que ya se describió anteriormente, los complejos *CYC/CDK* se activan por la fosforilación en T160 de CDK (catalizada por la CAK, *CDKD/CDKF*) permitiéndole así, la fosforilación de sus proteínas blanco para entrar a la fase M. Durante la mitosis, en la

metafase, las proteínas CDC20 y CCS52 activan y dan especificidad al complejo promotor de anafase (APC), dirigiendo la degradación de ciclinas por la vía del proteasoma 26S y la consecuente salida de mitosis (Fig 3)(1, 2 y 12).

REGULACIÓN POR FITOHORMONAS Y AZÚCARES

Entre las fitohormonas u hormonas vegetales que participan en la regulación de la expresión de genes del ciclo celular y su progresión se encuentran las auxinas y las citocininas. Otras fitohormonas también tienen alguna influencia en el ciclo celular, sin embargo, han sido menos caracterizadas. Tal es el caso del ácido abscísico (ABA), el etileno, el ácido jasmónico y los brasinoesteroides (13) (Fig 2). Se ha sugerido que estas últimas fitohormonas juegan un papel en la adaptación de la actividad meristemática a las condiciones externas y al programa morfogénico vegetal.

Las auxinas juegan un papel importante en casi cualquier aspecto del desarrollo vegetal (14). Estas fitohormonas promueven la actividad del ciclo celular y, al mismo tiempo que aumentan la expresión de genes involucrados en la transición G1/S y G2/M, estimulan la degradación de proteínas inhibitoras (15). Un ejemplo de ello, es la sobreexpresión de la CYCA2;2 de alfalfa, en presencia de auxinas. La función de esta ciclina está involucrada en ciclos mitóticos meristemáticos durante el desarrollo post-embionario.

Similar a las auxinas, las citocininas también juegan un papel esencial en el crecimiento de las plantas y su desarrollo. Estas fitohormonas retrasan la senescencia, influyen en la formación de tallo, aumentan la capacidad de atraer recursos a los tejidos vegetales y promueven proliferación al participar en el control de las transiciones G1/S y G2/M. Se ha observado que la presencia de citocininas incrementa la expresión de una CYCD3 en *Arabidopsis*, regulador clave de la transición G1/S. Adicionalmente, se ha sugerido que la expresión de ciclinas tipo B o mitóticas también puede ser regulada por la acción de esta fitohormona.

Uno de los principales puntos de control de las citocininas en el ciclo celular es, probablemente, la estimulación de la de-fosforilación de la tirosina 15 y la subsecuente activación de la CDK. Además, durante la formación de la hoja, éstas son necesarias para la celularización y desarrollo adecuado del tejido.

Las fitohormonas pueden presentar interacciones sinérgicas para generar señales que controlan la expresión génica y modulan, post-traduccionalmente, a sus proteínas blanco. Por ejemplo, las señales

generadas por auxinas y citocininas interaccionan para controlar la expresión de una CDKA y su subunidad reguladora, la CYCD3, en tallos de tabaco (15).

El ABA es otra hormona de particular importancia para el ciclo celular. Es considerada como una hormona que inhibe el crecimiento, ya que afecta a algunas enzimas específicas durante este proceso. En la mayoría de los casos, la respuesta a ABA es lenta y requiere cambios en la expresión génica. En diferentes tejidos vegetales se ha descrito que ABA es un inhibidor de ciclo celular y de la síntesis de ADN, y también se ha demostrado que su presencia induce la expresión del gen que codifica para una proteína inhibitora, KRP1, la cual se une e inhibe la actividad del complejo CYCD/CDKA. En consecuencia, las células se detienen en la transición G1/S (Fig 2).

Los azúcares son la fuente de carbono más importante para la planta, indispensables para la división celular. Las células de tejidos meristemáticos importan hexosas, mientras que los tejidos diferenciados prefieren la sacarosa. Debido a que la sacarosa es la molécula principal de transporte de carbono en plantas, los meristemos requieren invertasas extracelulares que hidrolicen al disacárido. Los azúcares presentan un efecto regulador sobre el ciclo celular, sin embargo, no es claro si dicho efecto se debe a una simple disponibilidad de energía y esqueletos de carbono, o si la concentración del azúcar per se es traducida como una señal. Por ejemplo, se ha observado una correlación positiva entre los niveles de expresión de varias ciclinas (CYCD2;1, D3;2, A3;2 y B2;1) y los niveles de monosacáridos endógenos en células en suspensión de tabaco. En dichas células la duración de la fase S y G2 puede ser modificada al variar los niveles endógenos de monosacáridos (15).

La interacción de las señales orquestadas por los azúcares y algunas fitohormonas se ha demostrado en *Arabidopsis* y tabaco. Por ejemplo, las auxinas inducen la sobreexpresión de ciclinas tipo D, pero esta expresión dependiente de auxinas es afectada de manera diferencial si también se encuentran presentes azúcares o citocininas.

Finalmente, se ha reportado que algunas proteínas importantes para el ciclo celular (RBR y E2F) son degradadas vía proteasoma 26S en *Arabidopsis* cuando la planta es sometida a deficiencia de sacarosa, provocando que se detenga el ciclo celular en la fase G2.

PERSPECTIVAS

En los últimos años se han hecho contribuciones importantes para entender los mecanismos de

regulación del ciclo celular y su relación con el desarrollo de las plantas. Se sabe, por ejemplo, que no basta solamente la presencia de cierta ciclina para desencadenar eventos dentro del ciclo celular, sino que, también son importantes las asociaciones que en ciertos momentos ésta pueda establecer con otras proteínas relevantes del ciclo celular. En este sentido, recientemente se han desarrollado

estrategias para revelar los mapas de interactomas, particularmente en *Arabidopsis*. Sin embargo, se requiere de nuevas investigaciones para entender con más profundidad el control del ciclo celular a través de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas reguladoras del ciclo celular, así como de la fina regulación por su localización subcelular, expresión génica, síntesis *de novo* y degradación.



REFERENCIAS

1. Vázquez-Ramos JM, Sánchez MP (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res* 13:113-130.
2. Dirk Inze (Eds.) (2007) *Cell cycle and plant development*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. p 364.
3. Kawamura K, Murray JA, Shinmyo A, Sekine M (2006) Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase *in vitro*. *Plant Mol Biol* 61:311-327.
4. Van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Stals H, Van Isterdael A, Neiryck S, Bukkel Y, De Bodt S, Maere S, Laukens K, Pharazyn A, Ferreira PC, Eloy N, Renne C, Meyer C, Faure JD, Steinbrenner J, Beynon J, Larkin JC, Van de Peer Y, Hilson P, Kuiper M, De Veylder L, Van Onckelen H, Inzé D, Wutters E, De Jaeger G (2010) Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Sys Biol* 6:397
5. Van Leene J, Boruc J, De Jaeger GD, Russinova E, De Veylder L (2011) A kaleidoscopic view of the *Arabidopsis* core cell cycle interactome. *Trends in Plant Sci* 16:141-150.
6. Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JAH (2005) Global analysis of the cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41:546-566.
7. Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla LP, García E, Vázquez-Ramos JM (2011) The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plantarum* 143:297-308.
8. Strzalka W, Ziemienowicz A (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot* 107:1127-1140.
9. Baíza AM, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J Plant Physiol* 135:416-421.
10. Sabelli PA, Liu Y, Dante RA, Lizarraga LE, Nguyen HN, Brown SW, Klingler JP, Yu, J, LaBrant E, Layton TM, Feldman M, Larkins BA (2013) Control of cell proliferation, cell size, and cell death by the retinoblastoma-related pathway in maize endosperm. *Proc Natl Acad Sci* doi: 10.1073/pnas.1304903110.
11. Sabelli PA, Dante RA, Leiva-Neto JT, Jung R, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA (2005) RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proc Natl Acad Sci* 102:13005-13012.
12. Dirk Inzé and Lieven De Veylder (2006) *Cell Cycle Regulation in Plant Development*. *Ann. Rev. Genet* 40:77-105.
13. Del Pozo JC, Lopez-Matas MA, Ramírez-Parra E, Gutiérrez C (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiol Plant* 123:173-183.
14. De Veylder L, Beeckman T, Inzé D (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:655-665.
15. Hartig K, Beck E (2006) Crosstalk between auxin, cytokinins and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol* 8:389-396.

EL USO DE LA ECUACIÓN DE HENDERSON-HASSELBALCH PARA EL CÁLCULO DEL PH EN SANGRE*

Juan Pablo Pardo Vázquez y Deyamira Matuz Mares

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F.
Correo E: pardov@bq.unam.mx

RESUMEN

Los procesos fisiológicos que tienen lugar en nuestro organismo, como la función adecuada de las enzimas y el metabolismo celular, están influidos por el pH de nuestro medio interno. El equilibrio ácido-base (que determina el pH) es regulado por amortiguadores tanto intracelulares como extracelulares, así como por los sistemas renal y respiratorio. El principal sistema amortiguador de la sangre es el formado por el par bicarbonato/ácido carbónico, sin embargo la nomenclatura general de los sistemas amortiguadores (base conjugada/ácido) conduce al uso incorrecto de los términos en la ecuación de Henderson-Hasselbalch para el sistema de bicarbonato/ácido carbónico.

PALABRAS

CLAVE:

pH, sangre, amortiguadores, bicarbonato, ácido carbónico, Henderson-Hasselbalch.

ABSTRACT

Physiological processes that take place in our body, such as the proper function of enzymes and cellular metabolism are influenced by the pH of our internal environment. The acid-base balance (to determine the pH) is regulated both intracellular and extracellular buffers, as well as renal and respiratory systems. The main blood buffer system is formed by the pair bicarbonate/carbonic acid, however the general classification of the buffer systems (conjugate base/acid) leads to the incorrect use of the terms in the Henderson-Hasselbalch equation for the bicarbonate/carbonic acid system.

KEY WORDS:

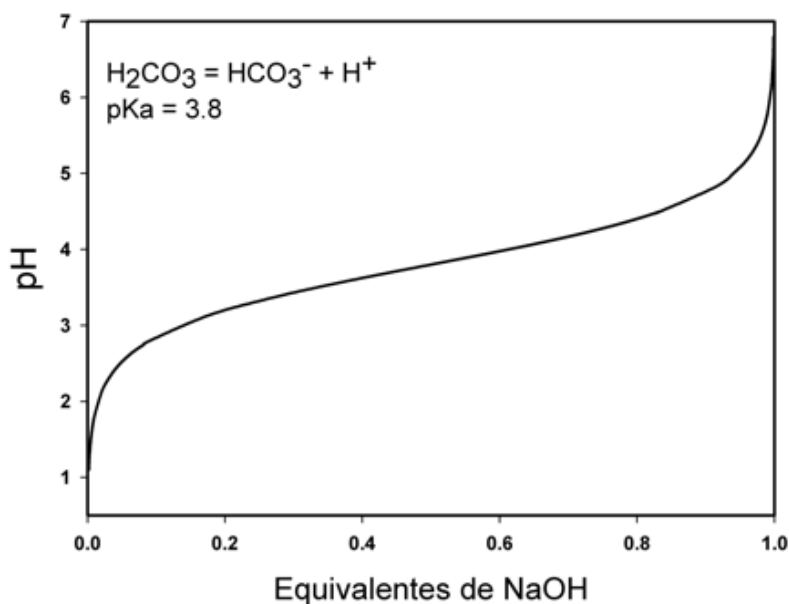
pH, blood, buffers, bicarbonate, carbonic acid, Henderson-Hasselbalch.

INTRODUCCIÓN

El equilibrio ácido-base es regulado por amortiguadores tanto intracelulares como extracelulares, así como por los sistemas renal (excreta de H^+ , amoníaco y regenera bicarbonato) y respiratorio (excreta dióxido de carbono) (1, 2). Conservar este equilibrio constituye un complicado proceso fisiológico que permite mantener estable el pH en la sangre. Para la función óptima de las enzimas y del metabolismo celular el pH debe mantenerse en valores entre 7,35-7,45 (3). Los trastornos del equilibrio ácido/base pueden interferir con los mecanismos fisiológicos que conducen a acidosis (pH arterial <7,35) o alcalosis (pH arterial > 7,45) y pueden poner en riesgo la vida (2, 4, 5). El principal sistema amortiguador de la sangre es el formado por el par bicarbonato/ácido carbónico (2, 6). Sin embargo,

el funcionamiento de este sistema es mucho más complejo que el de cualquier amortiguador clásico, como el de $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ (6, 7) o los residuos de histidina que forman parte de las proteínas (prot-his/prot-his H^+) (5, 8). Por otro lado, la nomenclatura general de los sistemas amortiguadores (base conjugada/ácido) conduce al uso incorrecto de los términos en la ecuación de Henderson-Hasselbalch para el sistema de bicarbonato/ácido carbónico. Por ejemplo, con frecuencia se menciona que hay que colocar en el denominador del término logarítmico de la ecuación de Henderson-Hasselbalch a la concentración del ácido carbónico, y esto debido a que no se define con precisión la relación que existe entre la concentración de ácido carbónico y la del dióxido de carbono, de tal suerte que a veces se pide calcular el pH de la sangre para una concentración de ácido carbónico de 1 mM (6, 7), o dado un pH y

Figura 1.
Curva de
titulación
para el ácido
carbónico.



una concentración del anión bicarbonato, encontrar la concentración del ácido carbónico en sangre. Como se muestra en esta pequeña revisión, en la ecuación de Henderson-Hasselbalch se debe utilizar la concentración de dióxido de carbono, ya que la concentración de ácido carbónico en la sangre está en el orden micromolar.

EL SISTEMA BICARBONATO/ÁCIDO CARBÓNICO

Como se muestra en la figura 1, el pK de este sistema es de 3.8 (9), por lo que el intervalo de pH en el que sirve como amortiguador del pH es de 2.8 a 4.8, ($pK \pm 1$). Como el pH del plasma es de 7.4, 3.6 unidades por arriba del pK de este sistema, la capacidad amortiguadora del par bicarbonato/ácido carbónico es prácticamente nula.

EL SER HUMANO ES UN SISTEMA ABIERTO

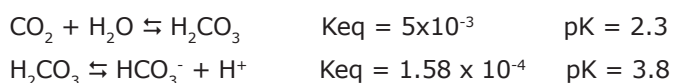
Sin embargo, cuando se toma en cuenta la enorme capacidad que tiene el ser humano de producir CO_2 a través del metabolismo y de eliminar este gas por el sistema respiratorio, se puede incluir el equilibrio de la reacción catalizada por la anhidrasa carbónica ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$) presente en los eritrocitos, las nefronas, intestino, páncreas, músculo estriado y el endotelio capilar pulmonar (7, 8) para explicar la capacidad del sistema bicarbonato/ácido carbónico para amortiguar el pH sanguíneo (3), la reacción es reversible y mirándola de izquierda a derecha, describe la hidratación del dióxido de carbono para dar al ácido carbónico (5), en sentido contrario, se tiene la formación del anhídrido del H_2CO_3 . La constante de equilibrio de esta reacción

es de 5×10^{-3} (9), de donde se puede calcular un pK de 2.3. Es importante mencionar que el valor de la constante de equilibrio de esta reacción incluye a la concentración de agua, debido a que ésta virtualmente se mantiene constante (55.5 M) (10).

En una segunda reacción el H_2CO_3 se disocia en un protón y su base conjugada:



El pK de esta reacción es de 3.8 (constante de equilibrio de 1.58×10^{-4} M). Si ahora se suman ambas reacciones:



La constante de equilibrio para la reacción resultante (7.9×10^{-7}) se obtiene de multiplicar las constantes de equilibrio de las reacciones que se suman, y el pK (6.1) es el resultado de sumar los dos valores de pK (5, 8, 9). De esta manera, si se considera que la especie que participa en la reacción es el anhídrido del ácido carbónico (CO_2) y se quita al agua debido a que ya está incluida en la constante de equilibrio, se obtiene la siguiente ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK + \log\left(\frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}\right)$$

Sin embargo, los laboratorios reportan la presión parcial de CO_2 (P_{CO_2}) (2) en vez de la concentración

de CO_2 , pero esta última se puede relacionar con la P_{CO_2} a través de la siguiente ecuación:

$$[\text{CO}_2] = 0.03 P_{\text{CO}_2}$$

En donde la concentración de CO_2 se expresa en mM, la P_{CO_2} en milímetros de mercurio (mm Hg) y las unidades del factor de conversión son: $\text{mM} \cdot (\text{mm Hg}^{-1})$. Así, la anterior ecuación de Henderson-Hasselbalch se transformaría en:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log([\text{HCO}_3^-]/(0.03 P_{\text{CO}_2}))$$

DATOS DE LABORATORIO

Supongamos que obtenemos los siguientes valores:

$$\text{pH} = 7.4$$

$$[\text{H}^+] = 3.9811 \times 10^{-8} \text{ M (se calcula a partir del pH)}$$

$$\text{HCO}_3^- = 24 \text{ mM}$$

$$[\text{CO}_2] = 1.2 \text{ mM}$$

Si ahora se supone que el sistema está en equilibrio (y esta es una suposición razonable, ya que las constantes de velocidad asociadas a estas reacciones son grandes), se puede calcular la concentración de H_2CO_3 , dadas las concentraciones de CO_2 y HCO_3^- descritas anteriormente, de la siguiente manera:

Se comienza con la reacción de disociación del ácido carbónico



y se define la constante termodinámica para la disociación del ácido

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{HCO}_3^-] [\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

Al despejar la concentración del ácido carbónico se obtiene

$$[\text{H}_2\text{CO}_3] = \frac{[\text{HCO}_3^-] [\text{H}^+]}{K_{\text{eq}}}$$

Si se sustituyen los valores que corresponden a las concentraciones de bicarbonato, hidrogeniones y de la constante de equilibrio, se obtiene que la concentración de ácido carbónico en sangre es de 6.05 μM ($6.05 \times 10^{-6} \text{ M}$). La concentración de este ácido es aproximadamente tres órdenes de magnitud más pequeña que la concentración de CO_2 (1 mM). Si se sustituye la verdadera concentración de ácido carbónico en la ecuación de Henderson Hasselbalch sin cambiar el valor del pK de 6.1, se obtiene un resultado (9.7) que nada tiene que ver con el pH de la sangre (7.4). Sin embargo, si se utiliza el pK de 3.8 y las concentraciones de H_2CO_3 (6.05 μM) y HCO_3^- (24 mM), se obtiene que el pH es de 7.4. En resumen, para conocer el pH de la sangre, en la ecuación de Henderson-Hasselbalch se tiene que utilizar la concentración de dióxido carbono y no la del ácido carbónico. 

REFERENCIAS

1. Siggaard-Andersen O (2006) Acid-Base Balance. En: Encyclopedia of respiratory medicine. Editores: Geoffrey J. Laurent and Steven D. Shapiro, Academic Press, Amsterdam; Boston, pp 5-10.
2. Ayers P, Dixon C (2012) Simple acid-base tutorial. J Parenter Enteral Nutr 36:18-23.
3. Carrillo Esper R, Visoso Palacios P (2006) Equilibrio ácido base. Conceptos actuales. Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int 20:184-192.
4. Meza García M (2011) Acid-base disturbances in Critically ill patients. Acta Med Per 28: 46-55.
5. Goel N, Calvert J (2012) Understanding blood gases/acidbase balance. Paediatrics and Child Health 22: 142-148.
6. Palazzo M G A (2009) Sodium bicarbonate the bicarbonate challenge test in metabolic acidosis: A practical consideration. Current Anaesthesia & Critical Care 20: 259-263.
7. Marshall WJ, Bangert SK, Lapsley M (2013) Bioquímica Clínica. 7a Ed. Elsevier Mosby, Barcelona, España, p 367.
8. Greenbauma J, Nirmalan M (2005) Acid-base balance: The traditional approach. Current Anaesthesia & Critical Care 16:137-142.
9. Segel IH (1976) Biochemical calculations. 2ª Ed. John Wiley & Sons, Inc, Canada, p 464.
10. Ortiz Salazar JP, García H (2010) Strong ion difference (SID): an approach to Stewart's theory. Rev Colomb Neumol 22: 17-21.

POLIAMINAS: PEQUEÑOS GIGANTES DE LA REGULACIÓN METABÓLICA*

Claudine Guasco Herrera, Jorge Luis Chávez Servín, Roberto Augusto Ferriz Martínez, Karina de la Torre Carbot, Elizabeth Elton Puente y Teresa García Gasca

Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Av. De las Ciencias s/n. Juriquilla, Querétaro. CP 76230. México. Correo E: tggasca@uaq.edu.mx

RESUMEN

Las poliaminas son moléculas alifáticas nitrogenadas de bajo peso molecular con grupos amino distribuidos de forma regular a lo largo de su estructura. Entre sus principales funciones destacan el empaquetamiento de ácidos nucleicos, la modulación de receptores de membrana y canales iónicos, la regulación de la expresión génica y la señalización celular. Son capaces de inducir apoptosis, participan en el ciclo celular, modulan el sistema inmune y participan en el balance redox del organismo. Se consideran moléculas antiinflamatorias y se asocian a la longevidad. Sin embargo, las poliaminas están implicadas en cáncer y enfermedades neurodegenerativas por lo que actualmente son dianas potenciales en farmacología.

ABSTRACT

Polyamines are nitrogenated aliphatic molecules of low molecular weight with regular-distributed amino groups along its structure. Among their main functions are packaging of nucleic acids, modulation of membrane receptors and ion channels, regulation of gene expression and cell signaling. They can induce apoptosis, participate in cell cycle, modulate the immune system and the redox balance of the body. They are considered anti-inflammatory molecules and are associated with longevity. However, polyamines are involved in cancer and neurodegenerative diseases, then they are potential targets in pharmacology.

INTRODUCCIÓN

Descubiertas por Antonie van Leeuwenhoek en 1678 (1), estas moléculas pequeñas son actualmente el foco de atención de numerosas investigaciones. Las poliaminas son moléculas policatiónicas constituidas por varios grupos amino a lo largo de la cadena (Fig. 1). Las aminas se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) (2). En los seres humanos las poliaminas provienen de dos fuentes, por un lado, un origen endógeno por la biosíntesis *de novo* e interconversiones entre ellas mismas, así como de las secreciones digestivas (especialmente intestinal y pancreática) y las descamaciones y los productos

del catabolismo de las propias células intestinales. Por otro lado, un origen exógeno a partir del consumo dietético y mediante la producción de poliaminas por los microorganismos intestinales (3). Estas moléculas pequeñas se relacionan con numerosos procesos celulares como la división celular, el empaquetamiento de ácidos nucleicos, la replicación del DNA y otros. En el presente trabajo se presenta un panorama general de estos pequeños gigantes del metabolismo.

SÍNTESIS DE POLIAMINAS

La L-arginina es un amino ácido precursor de muchas moléculas importantes en la fisiología celular, incluyendo las poliaminas. En microorganismos

PALABRAS CLAVE:
Agmatina, espermidina, espermina, putrescina, poliaminas.

KEY WORDS:
Agmatine, spermidine, spermine, putrescine, polyamines.

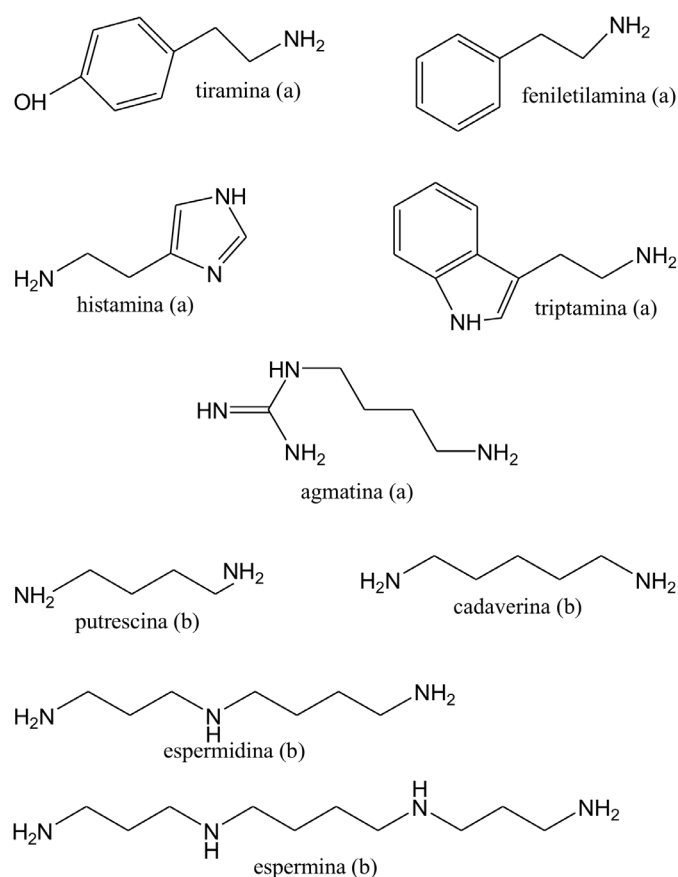


Figura 1. Fórmula química de las principales aminas (a) y poliaminas (b). Las poliaminas son pequeñas moléculas hidrocarbonadas con dos o más grupos amino a lo largo de su estructura, lo que les confiere su naturaleza catiónica.

y en plantas, las poliaminas se generan a través de la conversión de L-arginina a ornitina a través de la arginasa o arginina descarboxilasa (ADC) y posteriormente a agmatina y a putrescina. La mayoría de las células de mamíferos tienen la capacidad de producir las poliaminas que necesitan a partir de ornitina por acción de la ornitina descarboxilasa (ODC) que produce putrescina, la cual origina espermidina y espermina a través de la acción de la espermidina sintasa y espermina sintasa, respectivamente (Fig. 2). La cadaverina se produce a partir de lisina; la ruta depende de la especie y del momento del desarrollo en que se produce. Además, las poliaminas se originan a partir de los enterocitos exfoliados y éstos se han considerado como una posible fuente de poliaminas lumbinales (4, 5).

Las poliaminas se catabolizan mayoritariamente por desaminación oxidativa por la diaminoxidasa (DAO), enzima que se ha localizado en diferentes

tejidos como la mucosa intestinal, el hígado y el riñón. La putrescina se puede oxidar por la DAO, produciendo alfa-aminobutiraldehído en lugar de convertirse a espermidina. Este aldehído puede posteriormente ser oxidado a gama-aminobutirato (GABA) o dar origen a compuestos cíclicos. Además, la putrescina puede también acetilarse por una enzima microsomal y la monoacetilputrescina se oxida por una monoaminaoxidasa, para producir GABA, lo que ocurre en tejidos como el cerebro que tienen baja actividad de la DAO. La acetilación de las poliaminas puede llevarse a cabo también por una enzima nuclear que, con espermidina como sustrato, forma preferentemente N1-acetilespermidina. Las poliaminas acetiladas han sido encontradas en cantidades pequeñas en sangre y orina, pero no es clara la importancia de la acetilación en la excreción de estos compuestos (5).

La poliamina oxidasa (PAO) participa en la degradación de estas moléculas y de sus derivados acetilados, ya que cataliza la desaminación oxidativa de espermina produciendo espermidina o putrescina, dependiendo de la naturaleza del sustrato (6). La agmatina se cataboliza por la agmatinasa y forma putrescina (7). La actividad catabólica de PAO y de la espermina oxidasa generan altas cantidades de peróxido de hidrógeno lo cual favorece la apoptosis (8).

La homeostasis de las poliaminas está fuertemente regulada y depende del equilibrio entre la velocidad de su biosíntesis, catabolismo, excreción y absorción. El transporte a través de la membrana está reconocido como un factor importante en la homeostasis de poliaminas (9). Adicionalmente, la ODC es degradada muy rápidamente cuando el nivel de poliaminas incrementa. La degradación de esta enzima está dada por una vía independiente de ubiquitinas a través de la antizima, una proteína inducida por poliaminas. Una vez que la ODC se asocia con la antizima se degrada por la unidad 26S del proteasoma (10).

POLIAMINAS Y REGULACIÓN METABÓLICA

Numerosos estudios realizados en seres humanos y en animales de experimentación han evidenciado la importancia de las poliaminas en los estados de salud y enfermedad. Son fundamentales en el hombre en los procesos de señalización, replicación, transcripción, traducción, crecimiento, desarrollo, diferenciación y apoptosis celulares. Participan en la maduración y mantenimiento del tracto gastrointestinal, en la estimulación del sistema inmunitario, en la modulación de diferentes actividades enzimáticas. Están relacionadas en la carcinogénesis y en el crecimiento de tumores, así

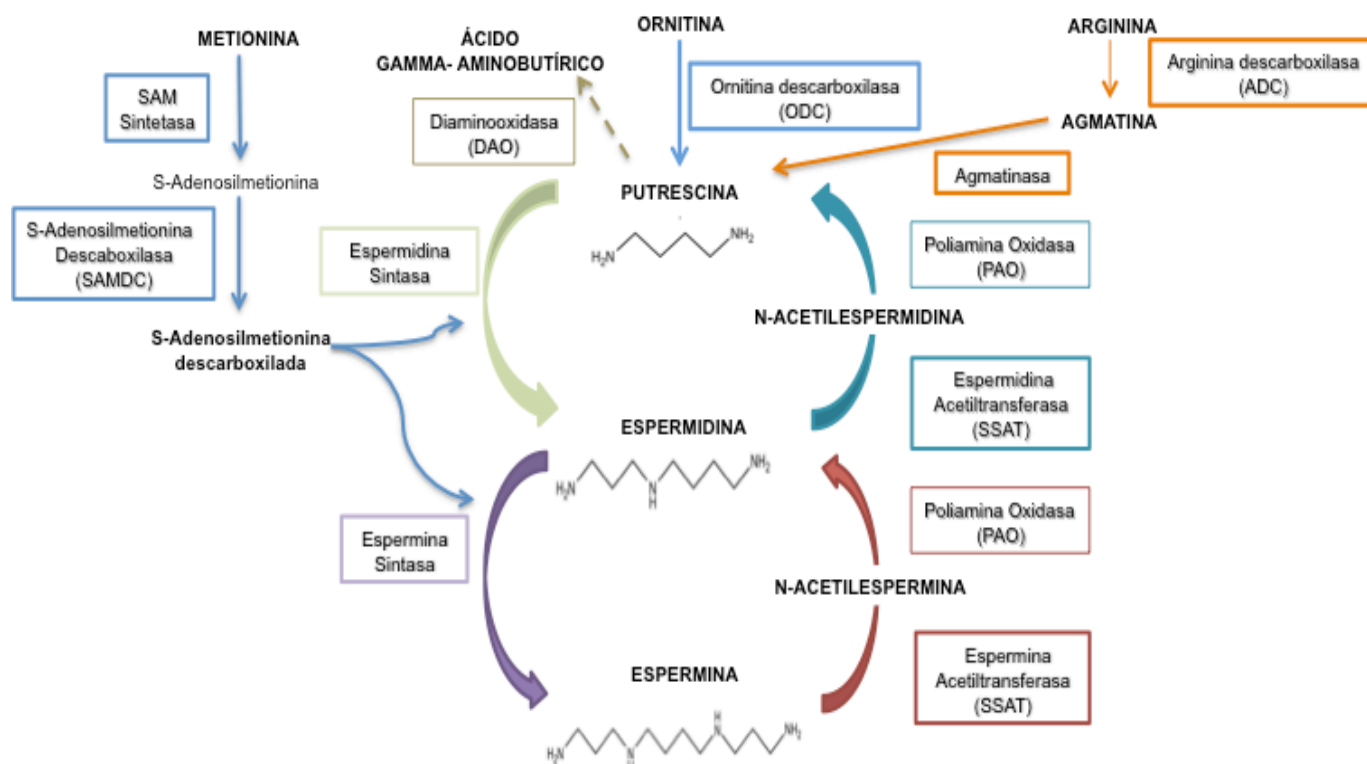


Figura 2. Metabolismo general de las poliaminas. Las poliaminas provienen principalmente de dos amino ácidos, la ornitina y la arginina y dependen de la S-adenosilmetionina como agente metilante. A su vez se pueden interconvertir unas en otras mediante dos reacciones acopladas. La desacetilación, mediada por una poliamina oxidasa supone un mecanismo de control de los niveles celulares de poliaminas libres.

como antioxidantes naturales, entre otras acciones (7) (Fig. 3).

1. Poliaminas, estabilización de ácidos nucleicos y expresión génica. Las poliaminas participan en la condensación y agregación del DNA. A bajas concentraciones la putrescina se une de forma preferencial a los surcos menores y mayores de la doble cadena del DNA, mientras que la espermina y la espermidina sólo a los mayores. A

altas concentraciones la unión de la putrescina es débil mientras que la espermidina y espermina se unen fuertemente a los surcos menores y mayores aunque la espermina se une preferentemente a los surcos mayores. También se han observado uniones electrostáticas al esqueleto azúcar-fosfato sin alterar la estructura B del DNA; por el contrario, las poliaminas favorecen la estabilización de la doble cadena (11). Se ha encontrado que las poliaminas modulan la conformación cuádruplex

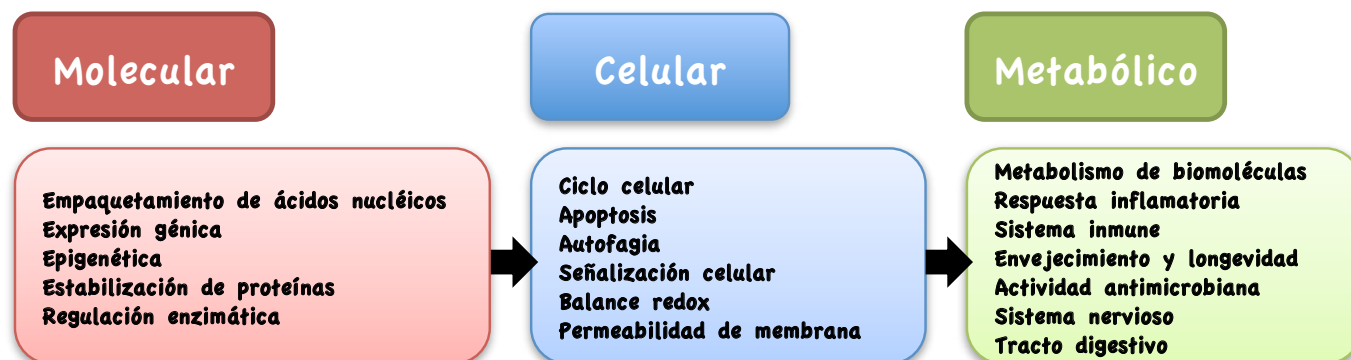


Figura 3. Procesos y sistemas biológicos en los que participan poliaminas. Las poliaminas participan en numerosos procesos biológicos, principalmente como reguladores metabólicos.

en la región promotora y afectan la expresión de genes como c-myc, c-fos, p21 y p53 (12, 13). La espermina se involucra en muchos procesos celulares como la regulación de la transcripción al afectar la capacidad de unión de proteínas al RNA y la interacción con el DNA para promover su condensación y protegerlo de la desnaturalización y agentes ionizantes como la radiación y especies reactivas de oxígeno (ROS) (5).

La metilación del DNA y las histonas es uno de los principales medios de control epigenético. El grupo metilo se deriva de una molécula esencial en la célula, S-adenosilmetionina (SAM); sin embargo, las poliaminas también requieren SAM para su síntesis. El incremento en la cantidad de poliaminas puede causar la interrupción de la metilación celular, lo que puede conducir a la expresión anormal de genes y a la interrupción de otros procesos celulares dependientes de la metilación (14).

2. Poliaminas y cascadas de señalización. La disminución de poliaminas en células intestinales induce la activación de la proteína cinasa B (Akt/PKB), mediando la supresión de la apoptosis a través de la inhibición de la caspasa 3 (15). Se ha observado que el agotamiento de poliaminas celulares induce la fosforilación de la cinasa 1 dependiente de fosfoinosítido (PDK1), que induce la fosforilación de Akt/PKB lo cual se asocia con el bloqueo de la apoptosis (16). Por otro lado, la espermidina ha mostrado capacidad para inhibir la inflamación en células de microglía bloqueando la vía del fosfoinosítido 3 cinasa (PI3K), la cual activa Akt/PKB y cinasas mitogénicas (MAPKs) así como la translocación de la subunidad p65 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y la expresión de interleucina 6 (IL6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (17). La espermidina también estimula la fosforilación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1 y ERK2) y la activación del oncogen c-myc relacionado con procesos de malignización (18).

3. Poliaminas, apoptosis y proliferación celular. En el tejido intestinal se ha observado que la disminución de poliaminas, debida a la inhibición de la ODC, inhibe la proliferación del epitelio intestinal (5) y promueve la acumulación de p53 lo que puede favorecer la apoptosis (12). El agotamiento de poliaminas provoca arresto del ciclo celular en G1 por inducción de p21 y Gadd45a y reducción de la expresión de ciclinas. Sin embargo, células carentes de poliaminas permanecen viables ya que se encienden mecanismos como la autofagia (13).

4. Poliaminas, estrés oxidativo, envejecimiento y longevidad. La forma en la que las poliaminas actúan sobre el estrés oxidativo parece estar vinculada con su capacidad para atrapar radicales libres (19) y para estimular la expresión de enzimas de fase 2 como la NAD(P)H quinona oxidoreductasa, la glutatión S-transferasa, la subunidad reguladora de la gama-glutamil cisteína ligasa y la UDP-glucuronil transferasa, vía la activación del elemento de respuesta a antioxidantes por el factor de transcripción Nrf2 (20). Sin embargo, el catabolismo acelerado de poliaminas genera estrés oxidativo (21).

El nivel de poliaminas disminuye con la edad de forma específica en cada tejido. Nishimura y col. (22) observaron que los niveles de espermidina disminuyeron en 11 de 14 tejidos en ratones hembra de 3, 10 y 26 semanas. Mientras que la espermina disminuyó únicamente en piel, corazón y músculo, la putrescina se mantuvo baja en todos los casos. La espermidina disminuyó marcadamente en timo, bazo, ovario, hígado, estómago, pulmón, riñón, corazón y músculo. En piel se observó un nivel máximo de espermidina en ratones de 10 semanas de edad y una reducción significativa en ratones de 26 semanas. Se observó que las poliaminas reducen el daño oxidante en ratones senoles. En levaduras se ha observado también la reducción de estrés oxidante a través de la inhibición de histona-acetiltransferasas, lo que regula mecanismos de autofagia, suprime la necrosis y aumenta la longevidad (23). En la "mosca de la fruta" (*Drosophila melanogaster*), el tratamiento con espermidina 1 mM es capaz de aumentar la longevidad y la actividad locomotora después del tratamiento con paraquat 20 mM. El tratamiento con paraquat 5 mM mostró que moscas atg7 -/- (gen 7 relacionado con autofagia) no mejoraron las tasas de sobrevivencia por lo que el mecanismo está relacionado con autofagia (24). Se ha observado que el envejecimiento cronológico (envejecimiento post-mitótico) y el envejecimiento replicativo (envejecimiento de células madre) en levaduras disminuyen significativamente por la suplementación de espermidina, efecto posiblemente relacionado con la reducción de la acetilación de residuos de lisina (Lys9, Lys14 y Lys18) de la histona H3 (25).

5. Poliaminas y cáncer. El metabolismo de las poliaminas está frecuentemente alterado en las células cancerosas y se asocia con concentraciones de poliaminas superiores a las observadas en células normales. De hecho, la inhibición de poliaminas o de su biosíntesis es una estrategia potencial para la quimioterapia del cáncer. Se ha demostrado en muchos sistemas celulares que las poliaminas

son necesarias para el crecimiento óptimo. Sin embargo, en enfermedades hiperplásicas hay un aumento en la actividad de la enzima ODC y de los niveles de las poliaminas en los tejidos dañados. Se ha observado la activación simultánea de la biosíntesis de poliaminas y la amplificación de protooncogenes (18, 26).

A pesar de que algunos tejidos como médula ósea, páncreas, mucosa intestinal y próstata presentan altos niveles de poliaminas, éstas aumentan en tejido tumoral. En sangre de individuos sanos los leucocitos presentan mayores niveles de poliaminas que eritrocitos y plaquetas pero en individuos con cáncer los niveles de poliaminas incrementan. En suero se encuentran en forma libre y no conjugada como en orina sin embargo, los niveles de poliaminas en orina podrían ser utilizados como marcadores de la eficacia de tratamientos quimioterapéuticos (27).

Uno de los primeros eventos en la proliferación de célula es la inducción de la biosíntesis de poliaminas y se sabe que la sobreexpresión de la ODC más allá de cierto umbral mínimo puede inducir la transformación celular y la promoción del tumor. Si bien, la presencia de poliaminas es necesaria para la proliferación celular, su acumulación puede desencadenar en apoptosis. La vía de retorno a través de la espermidina/espermina-N(1)-acetiltransferasa (SSAT) y PAO desempeñan un papel regulador importante en este comportamiento bivalente (28). Se ha postulado que la regulación de SSAT es clave para mantener la homeostasis de poliaminas y se visualiza como un blanco para la quimioterapia contra el cáncer (29).

En cáncer colorectal, la inhibición de la ODC disminuye el crecimiento de los tumores y el desarrollo de adenomas colorrectales. Se ha observado que la ingesta dietética de poliaminas por arriba de la cantidad promedio de una población (332 μM /día), se asocia con más un 39% de probabilidad de presentar adenoma colorectal, por lo que el riesgo de dicho padecimiento puede ser modificable a través de la dieta (30). Se sabe que las poliaminas están involucradas en el proceso de angiogénesis ya que se produce en respuesta al crecimiento del tumor. La difluorometilornitina (DFMO), que inactiva irreversiblemente a la ODC, es el ejemplo más estudiado de un inhibidor del metabolismo de las poliaminas que suprime el desarrollo del cáncer en modelos animales (31).

6. Poliaminas y dieta. La dieta provee una cantidad importante de poliaminas. La ingesta de poliaminas en la leche materna se considera esencial para la maduración postnatal del sistema inmunológico y el intestino delgado (32). La leche materna es un alimento rico en poliaminas. La

espermina, espermidina y putrescina se relacionan con el desarrollo gastrointestinal del recién nacido ayudando a evitar alergias alimentarias y disminuyendo la permeabilidad de las proteínas antigénicas. Las enzimas PAO y DAO generan aldehídos, aminoácidos y peróxido de hidrógeno en calostro humano y leche materna, lo que podría tener potenciales efectos antimicrobianos mediante estrés oxidante. Probablemente, PAO está presente en la leche materna durante todo el período de lactancia y contribuye así a los efectos protectores de la leche humana (6).

La agmatina muestra un papel positivo en la producción de secretagogos (como insulina, adrenalina y noradrenalina) y su beneficio a nivel neuronal, vascular, metabólico y en funciones terapéuticas. Su presencia en humanos se atribuye principalmente a la dieta, sobre todo en productos fermentados. En particular, niveles altos de agmatina se observan en las bebidas alcohólicas como el vino, la cerveza y el sake, lo que parece confirmar el papel de las levaduras en su producción (33). La dieta mediterránea contiene importantes cantidades de poliaminas, principalmente putrescina, espermidina y espermina, la putrescina es comúnmente la poliamina mayoritaria en alimentos. El aceite de oliva, hortalizas, frutas, vino, queso, aves y carne roja presentan mayor cantidad de estas biomoléculas antiinflamatorias (34) por lo que podrían estar implicadas en las propiedades nutraceuticas propias de la dieta mediterránea.

Por otra parte se han reportado niveles tóxicos de poliaminas en embutidos, lo que puede representar un riesgo potencial para la salud de las personas sensibles, o para quienes están en terapias farmacológicas con inhibidores de la monoaminooxidasa (35). Las aminos más frecuentes en alimentos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, β -feniletilamina, espermina y espermidina. Si bien, las intoxicaciones alimentarias más frecuentes están relacionadas con la histamina y la tiramina; cuyos aminoácidos precursores son la histidina y tirosina, respectivamente, la intoxicación por histamina es la más conocida, existiendo referencias desde finales del siglo XIX sobre la incidencia de esta enfermedad, conocida como enfermedad escombroides debido a que los trastornos tenían lugar tras la ingestión de pescados del grupo Escombroidae. La intoxicación producida por tiramina se conoce también como reacción del queso, debido a los altos niveles que ésta presenta en algunos quesos. Además de su propia toxicidad, estudios recientes han demostrado que la tiramina favorece la adhesión de organismos patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 a la mucosa intestinal (2).

CONCLUSIONES

Las poliaminas están involucradas en múltiples funciones biológicas así como en procesos patológicos. Su naturaleza catiónica les permite interaccionar con ácidos nucleicos y proteínas, por lo que se consideran elementos estructurales básicos y promueven la homeostasis. Su desregulación afecta procesos epigenéticos, de proliferación celular y apoptosis por lo que se ven relacionadas con el

cáncer y otros padecimientos. Su estudio como blancos terapéuticos es motivo de investigaciones en la actualidad. Adicionalmente, sus funciones como componentes de la leche materna revelan su importancia a nivel inmunológico y como posibles prebióticos. Se hace necesario profundizar en el conocimiento bioquímico y funcional para comprender mejor el papel de estos pequeños gigantes de la regulación metabólica y aprovechar dicho conocimiento en beneficio de la salud. 

REFERENCIAS

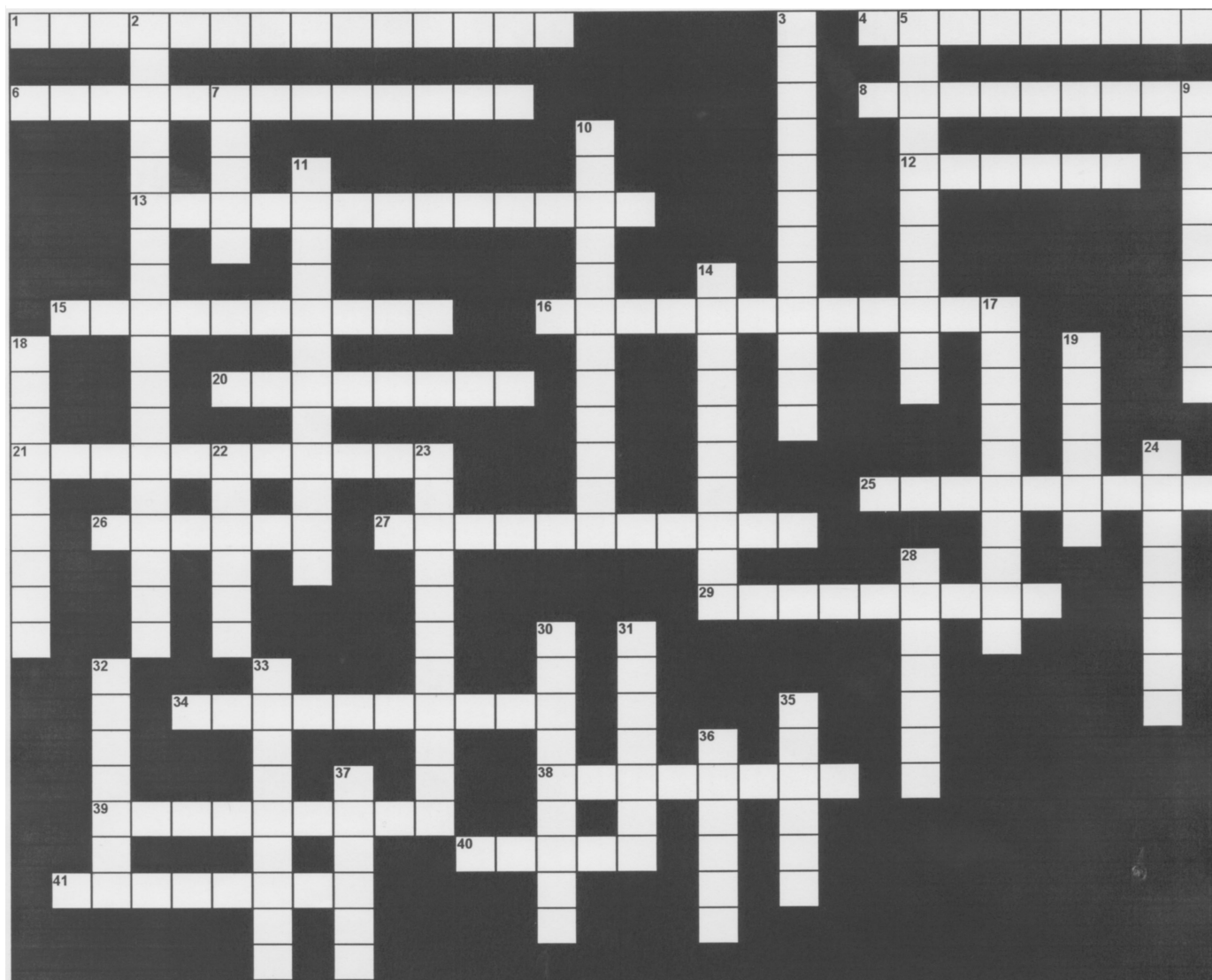
1. Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140:103-125
2. Fernández M, Alvarez MA (2008) Las Aminas Biógenas en los alimentos. *Agroscic*. 2-8. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/5771/1/IPLA_AGROCSIC_2.pdf
3. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F (2011) Polyamines in aging and disease. *Aging* 3:1-17
4. Greene JM, Feugang JM, Pfeiffer KE, Stokes JV, Bowers SD, Ryan PL (2013) L-arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. *Rep Biol Endocrinol* 11:15 pp
5. Wang S-Y, Lee Y-L, Lai Y-H, Chen JJW, Wu W-L, Yuann JMP, Su W-L, Chuang S-M, Hou M-H (2012) Spermine attenuates the action of the DNA intercalator actinomycin D, on DNA binding and the inhibition of trasncription and DNA Replication. *PLoS ONE* 7: e47101.
6. Bjelakovic L, Kocic G, Bjelakovic B, Najman S, Stojanovic D, Jonovin M, Pop-Trajkovic Z (2012) Polyamine Oxidase and Diamine Oxidase Activities in Human Milk during the First Month of Lactation. *Iran J Pediatr*. 22: 218-222.
7. Ruiz-Cano D, Pérez-Llamasa F, Zamora S (2012) Polyamines, implications for infant health. *Arch Argent Pediatr*. 110(3):244-250.
8. Chaturvedi R, Cheng Y, Asim M, Bussiére FI, Xu H, Gobert AP, Hacker A, Casero RA Jr, Wilson KT (2004) Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization. *J Biol Chem* 279:40161-40173
9. Aouida M, Leduc A, Poulin R, Ramotar D (2005) AGP2 encodes the major permease for high affinity polyamine import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280:24267-24276.
10. Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S, Tanahashi N, Tanaka K (2000) Degradation of Ornithine Decarboxylase by the 26S Proteasome. *Biochem Biophys Res Comm.* 267:1-6
11. Ouameur AA, Tajmir-Riahi HA (2004) Structural Analysis of DNA Interactions with Biogenic Polyamines and Cobalt(III) hexamine Studied by Fourier Transform Infrared and Capillary Electrophoresis. *J Biol Chem.* 279:42041-42054.
12. Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR (2009) Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cell Signal* 21:509-522
13. Landau G, Ran A, Bercovich Z, Feldmesser E, Horn-Saban S, Korkotian E, Jacob-Hirsh J, Rechavi G, Ron D, Kahana C (2012) Expression Profiling and Biochemical Analysis Suggest Stress Response as a Potential Mechanism Inhibiting Proliferation of Polyamine-depleted Cells. *J Biol Chem* 287:35825-35837.
14. Brooks Wesley H (2012) Autoimmune Diseases and Polyamines. *Clin Rev Allergy Immunol.* 42:58-70
15. Zhang M, Wang H, Tracey KJ (2000) Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Crit Care Med* 28:N60-N66
16. Keledjian KM, Marasa BS, Wang JY, Rao JN (2012) Induced PDK1 kinase activity suppresses apoptosis in intestinal epithelial cells by activating Akt signaling following polyamine depletion. *Int J Clin Exp Med* 5:221-228.

17. Choi YH, Park HY (2012) Anti-inflammatory effects of spermidine in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *J Biomed Sci* 19:31
18. Bachrach U, Wang Y-C, Tabib A (2001) Polyamines: New cues in cellular signal transduction. *Physiology* 16:106-109
19. Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA (1998) The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:11140-11145.
20. Kwak MK, Kensler TW, Casero RA Jr (2003) Induction of phase 2 enzymes by serum oxidized polyamines through activation of Nrf2: effect of the polyamine metabolite acrolein. *Biochem Biophys Res Commun*. 305(3):662-70.
21. Cerrada-Gimenez M, Pietilä M, Loimas S, Pirinen E, Hyvönen MT, Keinänen TA, Jänne J, Alhonen L (2011) Continuous oxidative stress due to activation of polyamine catabolism accelerates aging and protects against hepatotoxic insults. *Transgenic Res*. 20:387-396.
22. Nishimura K, Shiina R, Kashiwagi K, Iagarashi K (2006) Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *J Biochem*. 139: 81-90.
23. Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11:1305-14
24. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Bauer MA, Rockenfeller P, Eisenberg T, Brandhorst S, Sigrist SJ, Kroemer G, Madeo F (2012) Spermidine promotes stress resistance in *Drosophila melanogaster* through autophagy-dependent and independent pathways. *Cell Death Dis*. 3:e401
25. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Criollo A, Chiara MM, Tavernarakis N, Madeo F, Kroemer G (2009) Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging*. 1(12): 961-970
26. Bachrach U (2004) Polyamines and Cancer: Minireview article. *Amino Acids* 26:307-309.
27. Loria D, Sacerdote de Lustig E (1980) Poliaminas y cáncer. *Medicina (Buenos Aires)* 40:607-612
28. Medina MA, Quesada AR, Nuñez de Castro I, Sanchez-Jimenez F (1999) Histamine, Polyamines, and Cancer. *Biochem Pharmacol*. 57:1341-1344.
29. Pegg AE (2008) Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E995-E1010
30. Vargas AJ, Wertheim BC, Gerner EW, Thomson CA, Rock CL, Thompson PA (2012) Dietary polyamine intake and risk of colorectal adenomatous polyps. *Am J Clin Nutr*. 96:133-141.
31. Meyskens FL Jr, Gerner EW (1999) Review Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clin Cancer Res*. 5(5):945-51.
32. Atiya Ali M, Strandvik B, Sabel KG, Palme Kilander C, Strömberg R, Yngve A (2013) Polyamine levels in breast milk are associated with mothers' dietary intake and are higher in preterm than full-term human milk and formulas. *J Hum Nutr Diet*. doi: 10.1111/jhn.12156
33. Galgano F, Caruso M, Condelli N, Favati F (2012) Agmatine in Fermented Foods. *Front Microbiol*. 3: 1-7.
34. Thanh Binh PN, Soda K, Kawakami M (2011) Mediterranean diet and polyamine intake: possible contribution of increased polyamine intake to inhibition of age-associated disease. *Nutr Diet Suppl*. (3):1-7.
35. Papavergou EJ, Savvaidis IN, Ambrosiadis IA (2012) Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chem*. 2012 135:2750-2755.

CRUCIBIOQ[®]

BASES QUÍMICAS PARA LA BIOQUÍMICA

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



HORIZONTALES

1 Reacción que implica la pérdida de una molécula de agua al interactuar un alcohol con un ácido carboxílico, un ejemplo es cuando el glicerol reacciona con tres moléculas de ácido graso da lugar a la grasa neutra.

- 4** Cuando este grupo se encuentra en el extremo de una cadena hidrocarbonada da lugar a aldehídos, cuando está en el medio de la misma son cetonas y cuando además tiene a un hidroxilo presente recibe el nombre de ácido.
- 6** El término de _____ no covalentes reúne a diferentes tipos de unión, como son: fuerzas de van der Waals, puente de hidrógeno, enlaces iónicos y atracciones hidrofóbicas que son

muy importantes en el estudio de los sistemas biológicos.

- 8** Elemento químico que junto al carbono, hidrógeno y oxígeno constituyen el 99.33% del cuerpo humano, en la dieta se ingiere especialmente en las proteínas.
- 12** Son las moléculas orgánicas que tienen un átomo de oxígeno que une a dos de carbono; como ejemplos en bioquímica se tiene a los di o polisacáridos que son el producto de unión de dos o muchas moléculas de carbohidratos.
- 13** Se define como la emisión espontánea de partículas α , β o γ que provienen de la desintegración de un determinado núcleo, ésta puede ser natural o artificial; los compuestos que tienen isótopos de elementos con esta característica se emplean en investigación como marcadores ya que a través de su rastreo se puede seguir una ruta metabólica; la unidad básica es el Curio y es la cantidad de actividad que equivale a la que hay en un gramo de radio.
- 15** Se encuentran colocados en los diferentes niveles de energía definidos por su distancia a partir del núcleo y son retenidos cerca de éste por fuerzas de atracción electrostáticas; pueden pasar de una capa externa a una interna emitiendo un *cuantum* de energía.
- 16** Son todas las moléculas que debido a su polaridad ya sean iónicas o polares sin carga se mezclan con el agua ya sea formando soluciones formales o bien suspensiones o dispersiones coloidales cuando son moléculas de alto peso molecular como algunas proteínas o almidones.
- 20** Las moléculas que presentan una asimetría óptica son imágenes especulares y por lo tanto no superponibles; el término se deriva de $\chi\epsilon\iota\pi\omicron$ que en griego significa mano.
- 21** Son las moléculas en las que una parte de ellas es polar con carga y la otra es apolar, por lo tanto, una porción de ella es hidrofílica y la otra hidrofóbica, estas características les permiten formar películas monomoleculares, micelas o bicapas participantes estas últimas, de las membranas biológicas.
- 25** Estructuras complejas de alto peso molecular, representan a las moléculas más abundantes de los carbohidratos y las proteínas, así como a los ácidos nucleicos.
- 26** El agua es una molécula polar que se comporta como un _____ debido a una distribución asimétrica de sus electrones los que se concentran alrededor del oxígeno, mientras que los hidrógenos presentan una carga parcial positiva.
- 27** Así se nombra en bioquímica a la unión éter cuando se reúnen dos o más moléculas de carbohidratos para formar estructuras más complejas, ocurre la liberación de un hidrógeno de uno de los participantes y de un hidroxilo del otro, lo que da lugar a una molécula de agua.
- 29** Partículas presentes en el núcleo, en general su número es igual al de protones, aunque este valor puede variar dando lugar a los isótopos, los que pueden ser estables o inestables. Un ejemplo de isótopo estable es el Cl en el que de 100 átomos, 75% tienen 17 protones y 18 neutrones y el 25% 17 protones y 20 neutrones, de donde sale que la masa del Cl es 35.5 uma.
- 34** Tipo de isomería que presentan el ácido fumárico que tiene una configuración *cis* y el ácido maleico que es *trans*, el primero es participante de reacciones biológicas y el segundo es un tóxico inhibidor de las transaminasas.
- 38** Moléculas con la misma composición pero con distinta estructura ya sea de grupo funcional, de posición o bien diferente estereoisomería ya sea R y S o *cis* y *trans*.
- 39** El puente de _____ es el que se establece entre un átomo de una molécula con carga parcial positiva y un átomo aceptor electronegativo; esta unión se encuentra en proteínas, ácidos nucleicos y conglomerados de agua.
- 40** Grupo funcional básico constituido por nitrógeno y según la cantidad de hidrógeno puede ser primario (RNH_2), secundario (R_2NH), terciario (R_3N) o cuaternario [$(\text{R}_4\text{N})^+$]; como ejemplos los aminoácidos lo tienen primario y la colina, cuaternario.
- 41** Grupo funcional constituido por un átomo de carbono y uno de oxígeno, situado en uno de los dos extremos de una molécula hidrocarbonada; por ejemplo el derivado del ácido fórmico se emplea para la preservación de tejidos y el del ácido glicérico es la molécula precursora de la glucosa.

VERTICALES

- 2 Es la tendencia que tiene un átomo o molécula para atraer electrones, el elemento químico que tienen más alto este valor es el flúor seguido del oxígeno, esta característica es la que permite que el agua sea líquida.
- 3 Debido a las características de algunos de los residuos participantes en las proteínas que excluyen al agua, las interacciones _____ son determinantes para definir la conformación espacial de la molécula.
- 5 Así se designa a los átomos de carbono que en algunas moléculas tienen cuatro sustituyentes diferentes y con ello tienen la capacidad de girar el plano de luz polarizada, como por ejemplo, el carbono α de los aminoácidos (a excepción de la glicina).
- 7 Este enlace se forma con la participación de un grupo carboxilo y un grupo amino, que al reaccionar liberan los elementos de una molécula de agua; mediante esta unión se realiza la polimerización de los aminoácidos por lo que generalmente se le designa como unión peptídica.
- 9 Proceso mediante el cual los seres vivos generan la energía necesaria para su funcionamiento, un participante de este proceso es el oxígeno de los pulmones que es liberado por los eritrocitos y distribuido por todo el organismo.
- 10 Son los estereoisómeros llamados también isómeros ópticos, son imágenes especulares, no se pueden superponer, desvían la luz polarizada a la derecha (R) o a la izquierda (S); su participación biológica es diferente, por ejemplo la (R)-(+)-talidomida es sedante y la (S)-(-)-talidomida es teratogénica; (R)-propanolol es anticonceptivo y (S)-propanolol es β -bloqueador.
- 11 Son ácidos orgánicos constituidos por una cadena hidrocarbonada con la presencia de un grupo hidroxilo unido a un carbonilo; el enlace entre el átomo de oxígeno y el de hidrógeno es extremadamente polar ya que al ponerse en agua se ionizan, algunos de ellos son constituyentes de las grasas, otros son intermediarios del ciclo de Krebs, etc.
- 14 Nombre que recibe el mecanismo cuando a un átomo o molécula se le desprende un electrón, el resultado es un catión porque queda con un protón más que los electrones; cuando por el contrario se incorpora un electrón el producto es un anión.
- 17 Son sistemas homogéneos formados por uno o más solutos y uno o más solventes en donde cada uno de los participantes pierde sus características individuales; el tamaño de las partículas a disolver tienen un diámetro de hasta un 1 nm; los ácidos, las bases y las sales se encuentran en forma iónica.
- 18 Tipo de unión que se establece cuando dos átomos se asocian para completar el número de electrones máximo de una capa, este enlace que tiene mucha importancia en el estudio de la química orgánica; la energía que se requiere para un romper un enlace de este tipo es aproximadamente de $100 \text{ kcal mol}^{-1}$.
- 19 Se llaman radicales _____ a los átomos o moléculas que en su capa de valencia tienen un electrón desapareado o bien que los tienen en exceso; son altamente inestables, muy reactivos y de vida muy corta.
- 22 Están compuestos por un núcleo donde se alojan protones y neutrones y por una o varias órbitas donde gravitan los electrones, la gran mayoría se encuentran en la naturaleza, pero algunos como Pu, Am, Cm, entre otros se han sintetizado en el laboratorio.
- 23 Grupo funcional en el que participan azufre e hidrógeno, forma parte de algunos aminoácidos, ante la liberación de los hidrógenos del grupo funcional se forman los enlaces con una energía de unión de 60 kcal/mol , característicos de muchas proteínas.
- 24 Está constituida por dos o más átomos iguales o diferentes, la posibilidad de atracción entre dos átomos depende de la disposición de los orbitales respectivos; es la parte más pequeña de la materia que conserva sus características.
- 28 Son los enlaces establecidos entre grupos con cargas opuestas que se atraen mutuamente, de modo que sus cargas se anulan y dan lugar a las moléculas.
- 30 Grupo funcional cuya fórmula condensada es CH_6N_3 , le proporciona al aminoácido que lo posee el valor de pK_a más elevado ($\text{pH} = 12.48$), cuando se compara con los otros aminoácidos constitutivos de las proteínas.

- 31** Elemento químico presente en toda la materia orgánica, las plantas convierten al anhídrido en productos complejos que lo contienen, el consumo de éstos por los herbívoros y a su vez por los carnívoros permite volver a formar el anhídrido, estableciéndose un ciclo.
- 32** Grupo funcional de los compuestos orgánicos que tiene la misma composición que el grupo hidroxilo de los álcalis y a diferencia de éstos, puede ser primario, secundario o terciario, según la colocación del grupo funcional en la molécula.
- 33** Es un grupo funcional derivado de un ácido fuerte que en su estado iónico reacciona con muchas moléculas orgánicas elevando su nivel energético, forma parte de la molécula más importante en la transducción de energía, además de tener participación en nucleótidos coenzimáticos y en los ácidos nucleicos.
- 35** Partícula de carga positiva alojada en el núcleo, su número es igual al número atómico; pesa 1836 veces más que el electrón; en ocasiones, en bioquímica este término, se refiere al catión del hidrógeno.
- 36** Constituida por dos o más sustancias (elementos o compuestos) que se combinan en cualquier proporción, sin perder cada una de las participantes sus características individuales.
- 37** En la composición de este grupo funcional intervienen el oxígeno y el carbono, es el producto de la oxidación de un alcohol secundario, algunas moléculas que tienen este grupo funcional son la fructosa, el piruvato y la ribulosa.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Elizabeth Lira Silva¹, Ricardo Jasso Chávez¹ y Juan Pablo Pardo Vázquez²

¹Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología.

²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Correo: eli_lira_sil@hotmail.com

Cinética enzimática. Enzimas alostéricas

Análisis cinético de la PFK-1L de *Sparus aurata*, una enzima alostérica

Introducción

En la naturaleza existen enzimas y transportadores que participan en múltiples procesos y llevan a cabo diferentes reacciones químicas en una célula. Sin embargo, muchas de éstas enzimas no presentan una cinética clásica tipo Michaelis-Menten, donde la gráfica de velocidad inicial vs la concentración de sustrato en lugar de tener un comportamiento hiperbólico presenta un comportamiento sigmoidal. A este tipo de enzimas se les denomina enzimas alostéricas, las cuales poseen múltiples sitios de unión a diferentes ligandos denominados sitios de alostéricos (diferentes al sitio activo) estos ligandos pueden modificar sus propiedades cinéticas. En este tipo de enzimas se puede presentar un fenómeno denominado cooperatividad positiva, cuando la unión de un ligando facilita la unión de la siguiente molécula e incrementa la afinidad por los sitios vacantes. Si el ligando en cuestión es el sustrato se denomina efecto homotrópico pero si es una molécula diferente (un activador o un inhibidor) se denomina efecto heterotrópico.

Para el estudio de las enzimas alostéricas se han propuesto dos modelos: 1) el modelo de transición concertada de Monod-Wyman-Changeux (MWC), en el cual se asume que la enzima pre-existe en un estado de equilibrio donde hay una mezcla de oligómeros de alta y baja afinidad y en donde los ligandos desplazan el equilibrio a favor de un estado u otro. Durante la transición, estos cambios conformacionales ocurren de manera concertada y simétrica en todas las subunidades y 2) el modelo de interacción secuencial de Koshland-Némethy-Filmer (KNF), en donde se asumen cambios secuenciales en las afinidades de los sitios vacantes conforme estos son ocupados (Segel, 1975).

El análisis cinético de una enzima se puede realizar mediante el ajuste por regresión lineal

y no lineal. El análisis por regresión lineal es ampliamente utilizado en cinética enzimática, para lo cual existen diferentes métodos de linealización, pero el más utilizado como una herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima K_s y V_{max} a partir de la ecuación de Michaelis-Menten es el método de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos $1/v$ vs $1/[S]$). Sin embargo, el análisis cinético de las enzimas alostéricas no se puede realizar utilizando la ecuación clásica de Michaelis-Menten, debido a que el gráfico de dobles recíprocos para una enzima alostérica es una curva y no es posible determinar sus parámetros cinéticos K_s y V_{max} directamente., por lo que se utiliza la ecuación de Hill (la ecuación de velocidad para enzimas alostéricas, ver ecuación 1), la cual considera una enzima con "n" sitios de unión a sustrato. Sin embargo, el coeficiente de Hill (n) solo es una aproximación del número de sitios que pueden enlazar al sustrato por molécula de enzima si la cooperatividad es muy grande. A partir de la ecuación de Hill es posible realizar un gráfico de dobles recíprocos ($1/v$ vs $1/[S]^n$) modificado para calcular la K_s y V_{max}

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{S^n}{K' + [S]^n} \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 1}$$

Donde:

n: número de sitios que pueden enlazar al sustrato (número de Hill)

K' es una constante que incluye los factores de interacción entre enzima-sustrato (a, b, c ...z), los cuales modifican la afinidad de la enzima conforme se une el sustrato a cada uno de los sitios activos. La constante permite calcular la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima $(K')^{1/n}$ y se relaciona de manera intrínseca con la constante de disociación $K_s = K_s^n (a^{n-1}b^{n-2}c^{n-3}...z^1)$.

Para calcular el número aproximado de sitios se debe realizar el ajuste no lineal a un gráfico de Hill o linealizar la ecuación de Hill para simplificarla.

La forma lineal de la ecuación de Hill (ecuación 1) se muestra a continuación:

$$\log \left(\frac{v}{V_{max} - v} \right) = n \log S - \log K' \dots \text{ecuación 2}$$

Donde la pendiente (n) es un índice del número de sitios (o subunidades).

Sin embargo, el gráfico de Hill presenta algunas desventajas ya que a velocidades específicas bajas se desvía de la linealidad, debido a que los complejos tienen menos de (n) moléculas de sustrato que contribuyen a la velocidad inicial, o porque la enzima tiene sitios reguladores no catalíticos que pueden ocuparse antes de que el sustrato se enlace al sitio catalítico, lo que causa un incremento en la pendiente del gráfico conforme disminuye la concentración del sustrato. Por lo que a muy bajas concentraciones la pendiente se aproxima al número de sitios que deberían estar ocupados antes de que cualquier reacción ocurra. Con altas concentraciones de sustrato, también es posible que ocurran desviaciones de la linealidad, debido a que es difícil detectar pequeños cambios en la velocidad conforme se incrementa la [S] o porque los sitios catalíticos poseen diferentes afinidades (Segel, 1975).

Para determinar la afinidad del sitio alostérico por un modulador se puede utilizar la ecuación de Búc para inhibidores (ecuación 3) o activadores alostéricos (ecuación 4), las cuales son la forma lineal del modelo de transición alostérica concertada propuesta por Monod, Wyman y Changeaux para enlazamiento exclusivo del sustrato y el activador a la forma R (relajada) y del inhibidor a la forma T (tensa) (Segel, 1975).

$$\frac{(V\alpha - v)^{1/n}}{v} = [I] \frac{L\alpha^{1/n}}{K_i} + (L\alpha)^{1/n} \dots \text{ecuación 3}$$

$$\frac{1}{b} = \frac{1}{(L\alpha)^{1/n}} = \frac{1}{K_S(L)^{1/n}} [S] + \frac{1}{L^{1/n}} \dots \text{ecuación 3a}$$

$$\left(\frac{v}{(V\alpha - v)} \right)^{1/n} = \frac{1}{(L\alpha)^{1/n}} + [A] \frac{1}{K_A L\alpha^{1/n}} \dots \dots \dots \text{ecuación 4}$$

$$b = \frac{1}{(L\alpha)^{1/4}} = \frac{1}{K_S(L)^{1/4}} [S] + \frac{1}{L^{1/4}} \dots \text{ecuación 4a}$$

Donde $V\alpha$ es la velocidad de la enzima a una concentración fija de sustrato y a una concentración alta de activador, v es la actividad de la enzima a una concentración dada de sustrato, es igual a $L/(1+S/K_S)^n$. L es la constante de transición alostérica ($L = [T_0]/[R_0]$) que representa la proporción del estado T (es decir la conformación con menor afinidad por el sustrato y activador y mayor afinidad por el inhibidor) y R (el estado conformacional con mayor afinidad por el sustrato y el activador y menor afinidad por el inhibidor). Las curvas de velocidad son más sigmoides conforme se incrementa L , lo que sugiere que el equilibrio favorece a $R_0 \leftrightarrow T_0$ favorece a T_0 . Sin embargo, la cooperatividad del sitio de unión de una enzima no sólo depende de " L " sino también del coeficiente de enlazamiento no exclusivo ($c = [K_R]/[K_T]$), que representa la proporción de las constantes de disociación del sustrato por el estado T y R. Cuando $c=0$, el conformero T no tiene afinidad por el sustrato (o por el activador). Se sabe que los inhibidores alostéricos se unen preferencialmente al estado T, por lo que " L " aumenta y las curvas de velocidad son más sigmoides, mientras que los activadores alostéricos se unen preferencialmente al estado R, por lo que " L " disminuye y las gráficas de velocidad son menos sigmoides.

Debido a la complejidad que representa determinar las constantes cinéticas para enzimas alostéricas, es muy frecuente utilizar el gráfico de Hill para establecer si la enzima en cuestión es cooperativa. Sin embargo, éste no permite obtener la constante de transición alostérica. Para estimar " L " y el número aproximado de sitios activos (n) de manera independiente uno del otro se puede utilizar la ecuación de Horn Börnig (ecuación 6), que es la forma lineal de la ecuación de enlazamiento exclusivo ($c=0$) (ecuación 5).

$$\frac{v}{V_m} = \frac{\alpha (1+\alpha)^{n-1}}{L' + (1+\alpha)^n} \dots \dots \dots \text{ecuación 5}$$

$$\log \left(\frac{\alpha V_m}{v} - \alpha - 1 \right) = (1-n) \log (1+\alpha) + \log L' \dots \dots \dots \text{ecuación 6}$$

Donde para un inhibidor es:

$$L' = L(1 + \beta)^n \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 7}$$

$$\log L' = \log L + n \log(1 + \beta) \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 8}$$

Mientras que L' para un activador es:

$$L' = \frac{L}{(1 + \gamma)^n} \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 9}$$

$$\log L' = \log L - n \log(1 + \gamma) \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 10}$$

Este tipo de gráfico produce líneas rectas, que permiten la determinación de n y L' (o L) por métodos de mínimos cuadrados, las pendientes de las líneas rectas son siempre números enteros y permanecen constantes con el cambio de " L ". Sin embargo, su uso se limita a enzimas alostéricas con enlazamiento exclusivo ($c = 0$), por lo que se pueden presentar errores sistemáticos debido a la posibilidad de que $c > 0$. Para utilizar esta ecuación, es necesario determinar previamente los valores de V_{max} y K_S , ya que α se define como el cociente S/K_S . También es necesario que existan moduladores alostéricos que permitan cambiar la cinética de sigmoide a hiperbólica (Comportamiento de Michaelis - Menten, $L = 0$).

Otra forma de analizar el análisis cinético de una enzima alostérico, es realizar el ajuste no lineal a partir de la ecuación de enlazamiento exclusivo (ecuación 5) utilizando el programa Origin 5.0 (figura 6). Este tipo de análisis por regresión no lineal ajusta los datos experimentales a una ecuación dada, lo que permite determinar los valores de los parámetros que minimizan la suma de los cuadrados de las distancias de los puntos de la curva, con el objetivo de minimizar el residual de la suma de cuadrados. Con esto es posible determinar simultáneamente todos los parámetros cinéticos y con ello se tiene una menor restricción en la elección de las variables controladas comparado con los métodos por ajuste lineal donde los datos se limitan a un intervalo lineal. Las desviaciones estándar disminuyen y aumenta la precisión al estimar los parámetros cinéticos debido a que no es necesario realizar transformaciones lineales.

En este trabajo se hace una revisión de los diferentes métodos y ecuaciones para analizar

la cinética de la PFK-1L de *Sparus aurata* (una enzima alostérica) en presencia de moduladores alostéricos.

Planteamiento del problema

La 6-fosfofructo-cinasa 1 (PFK-1) juega un papel importante en el control del flujo glucolítico tanto en mamíferos como en algunos parásitos (Sharma, 2011). Esta enzima cataliza la formación de fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6BP) a partir de fructosa-6-fosfato (Fru-6P) y Mg-ATP (Mediavilla, 2008). Además de los sitios catalíticos para Fru-6P y ATP, la PFK-1 de mamífero tiene sitios de unión alostéricos: sitios de activación para Fru-2,6BP, AMP, ADP, P_i , K^+ , NH_4^+ y sitios de inhibición para ATP y citrato.

La PFK-1 es una enzima tetramérica. En vertebrados existen tres loci que codifican para la expresión de subunidades de tipo P, M y L. Sin embargo, los tres tipos de subunidades se combinan para formar homo y heterotetrámeros de la PFK-1 con diferentes propiedades catalíticas y control alostérico (Moreno-Sánchez et al., 2012). Se ha descrito que hay isoformas específicas presentes en diferentes tejidos dependiendo de la expresión de cada subunidad. La subunidad M es la única presente en músculo esquelético de adultos, la subunidad P se encuentra en altos niveles en cerebro, mientras que en hígado se encuentra principalmente la subunidad L (PFK-1L), cuya expresión se regula por el estado nutricional y hormonal (Mediavilla, 2008).

Los peces carnívoros tienen baja capacidad para metabolizar carbohidratos y por lo tanto mantienen la hiperglucemia por más tiempo que los mamíferos. Es por esto que se ha descrito que su metabolismo puede mimetizar el perfil metabólico de diabetes tipo 2 en humanos (Mediavilla, 2008). Se ha demostrado que en peces carnívoros como *Sparus aurata*, se puede modificar la actividad de la PFK-1L y otras enzimas que participan en la glicólisis y la gluconeogénesis para tolerar la sustitución parcial de proteína por carbohidratos en su dieta, lo que produce un incremento en los niveles hepáticos de fru-2, 6BP, el cual además de ser un potente activador alostérico de la PFK-1, es también un inhibidor de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Mediavilla, 2008).

La caracterización cinética de la PFK-1 purificada se ha realizado en varios sistemas de mamíferos, parásitos, plantas y bacterias (Marín-Hernández, 2006; Sharma, 2011). Sin embargo, los antecedentes sugieren que la regulación del metabolismo

Tabla I

Efecto del ATP sobre la actividad de la PFK-1L a varias concentraciones de Fru-6P a pH 7.0.

Actividad PFK-1L (mU/ml)			
ATP (mM)			
Fru-6P (mM)	0.5	1	2.5
0.00	0	0	0
0.03	1.5	1.5	1.5
0.04	74	--	--
0.04	129	--	--
0.06	142	--	--
0.08	164	--	10
0.08	224	--	--
0.13	--	82	30
0.14	256.5	136	38
0.16	274	--	49
0.18	289.5	174	59
0.20	299	--	76
0.26	301	184	103
0.48	310.5	232	187
0.58	312	--	205
0.66	313	276	210
1.00	303	281	228

Tabla II

Efecto de la Fru-2,6BP sobre la actividad de la PFK-1L a varias concentraciones de Fru-6P a pH 7.0 y 2.5 mM ATP.

Actividad PFK-1L (mU/ml)		
Fru-2,6BP (μ M)		
Fru-6P (mM)	0	5
0	0	0
0.05	1.2	73
0.07	16	122
0.11	23	143
0.13	37	152
0.15	47	162
0.19	52	182
0.24	89	202
0.49	165	219
0.6	176	225
0.65	183	228
1	184	230

de carbohidratos en peces carnívoros puede ser diferente a lo descrito en mamíferos. Por lo que el análisis cinético de la PFK-1L de *Sparus aurata* podría arrojar información significativa sobre los mecanismos involucrados en el control de la vía glicolítica en estos organismos (Mediavilla, 2008). Además, se debe destacar que las enzimas alostéricas son importantes en términos de economía celular y control metabólico, mientras que los sitios alostéricos pueden ofrecer ventajas para diseñar y dirigir los fármacos manera selectiva y con ello ofrecer una alternativa terapéutica. En este caso en particular contra la diabetes tipo II.

La actividad de la PFK-1L se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la oxidación de NADH, el cual se midió espectrofotométricamente a 340 nm. La mezcla de reacción contenía: 100 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.15 mM NADH, 4 mM sulfato de amonio, 12 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM Fru-6-P, 0.675 U mL^{-1} aldolasa, 5 U mL^{-1} triosa fosfato isomerasa, 2 U mL^{-1} glicerol 3-deshidrogenasa y 0.02 mg proteína de la enzima parcialmente purificada. Se utilizaron diferentes sustratos y efectores como se indica para cada ensayo. 1 U = 1 μ mol de Fru-1,6-BP/min (o el consumo de 2 μ mol of NADH /min). Los ensayos cinéticos se realizaron a pH 7.0 utilizando Fru-6P como sustrato y algunos efectores como se indica en las leyendas.

La Tabla I muestra los valores de actividad de la PFK-1L variando ambos sustratos, Fru-6P y ATP. La Tabla II muestra los valores de la actividad de la PFK-1 y el efecto activador de la Fru-2,6BP; es importante mencionar que el medio de ensayo contenía a los activadores NH_4^+ y K^+ .

Con los datos proporcionados determinar los parámetros cinéticos de la PFK-1L de *Sparus aurata*: KS, Vmax, coeficiente de Hill (n), constante de transición alostérica (L) y constante de inhibición (Ki) o de activación (KA).



XXX CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA

2-8 de noviembre de 2014 · Guadalajara, Jal.



Comité Organizador

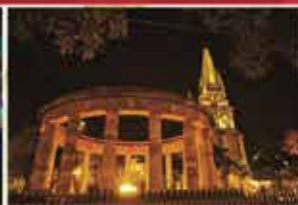
- Alicia González Manjarrez
- Miguel Lara Flores
- María Eugenia Gonsebatt
- Guadalupe Espín Ocampo

Comité Local

- Bertha Ibarra Cortés
- Alma R. Villalobos Arámbula
- Carlos Beas Zárate
- Alfredo I. Feria Velasco
- Luis E. Figueroa Villanueva
- Alfonso E. Islas Rodríguez
- José Sánchez Corona

Información

www.smb.org.mx
nacional@smb.org.mx



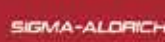
SEP



CIENCIA

Red de Investigación Científica de México, S.C.

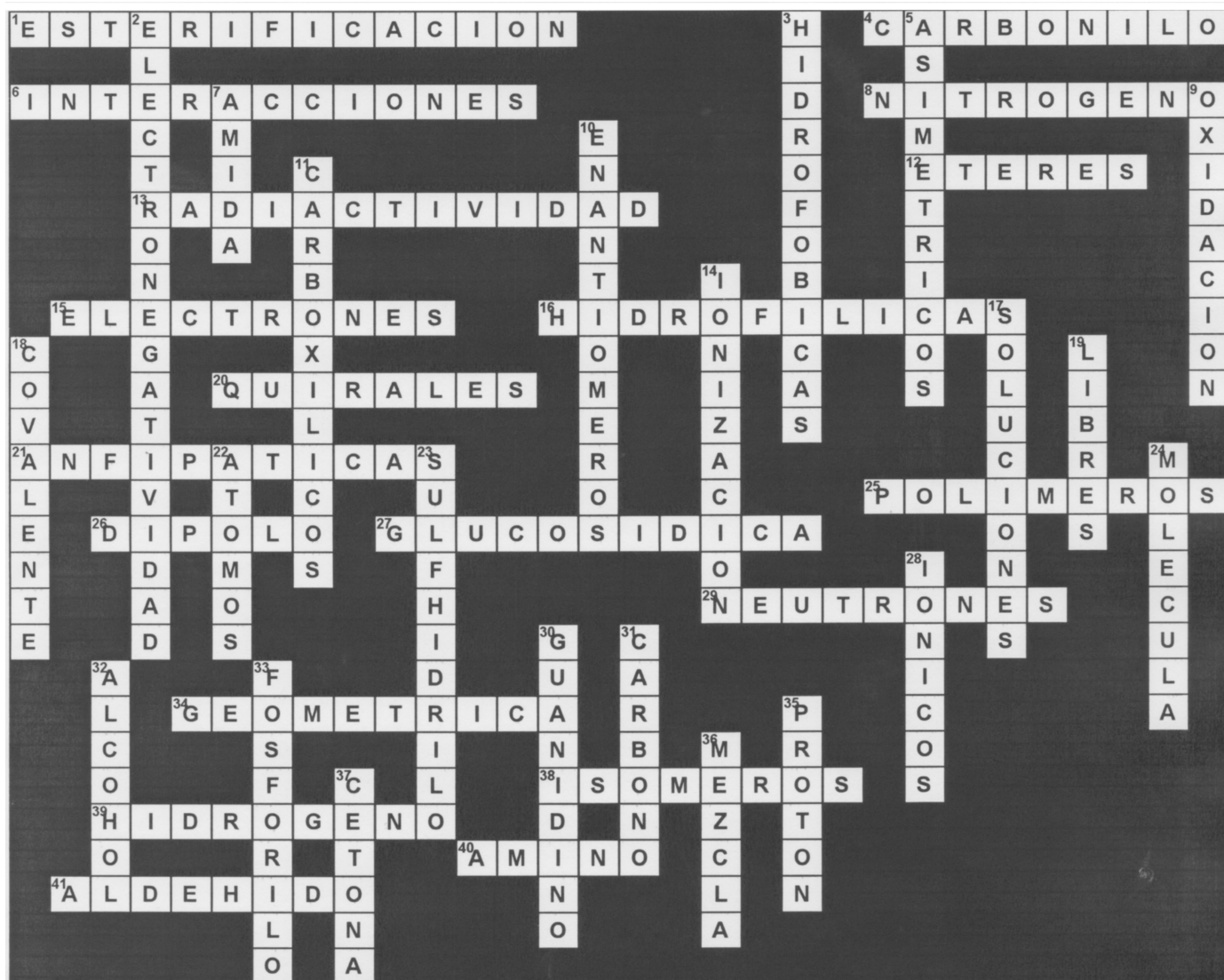
PELAEZ



SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ[®]

BASES QUÍMICAS PARA LA BIOQUÍMICA

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



RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Elizabeth Lira Silva¹, Ricardo Jasso Chávez¹ y Juan Pablo Pardo Vázquez²

¹Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología.

²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Correo: eli_lira_sil@hotmail.com

En la figura 1 se muestra la dependencia de la velocidad vs [Fru-6P] a concentraciones fijo-variables de ATP, y se observa que la enzima tiene un sitio catalítico y un sitio alostérico por ATP, ya que concentraciones crecientes de ATP inhiben la actividad, como previamente se ha reportado para otras PFK-1. Para una enzima alostérica con cooperatividad positiva, el gráfico de dobles recíprocos ($1/v$ vs $1/S$) genera una curva cóncava hacia arriba, y la velocidad máxima se puede obtener al graficar ($1/v$ vs $1/S^n$), donde "n" se aproxima al número de sitios activos de la enzima. Se ha reportado que la PFK-1 es un tetrámero, por lo que "n" debería tener un valor máximo de 4 (Moreno-Sánchez et al, 2012). A partir de la abscisa al origen del gráfico $1/v$ vs $1/S^4$, ver figura 1, se determinó que la $V_{\max}$ = 63.2 mU/mg.

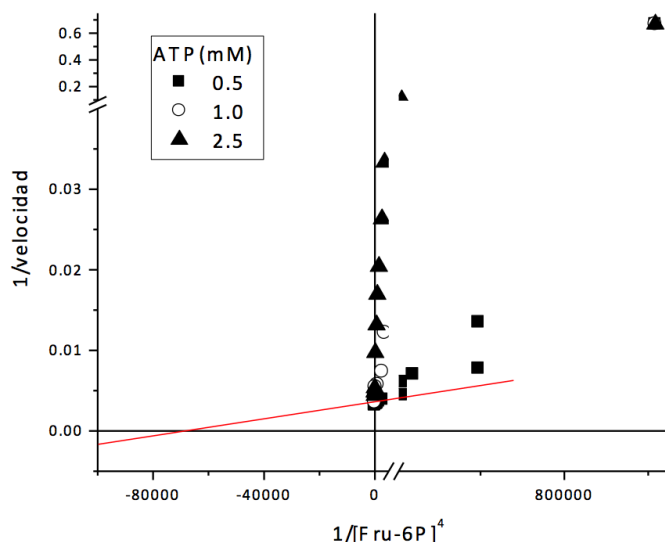


Fig. 1. Gráfica de $1/\text{velocidad}$ vs $1/(\text{Fru-6P})^4$ a pH 7.0.

Para conocer la afinidad del sitio alostérico por el ATP, se debe determinar el número de sitios o subunidades que forman la enzima.

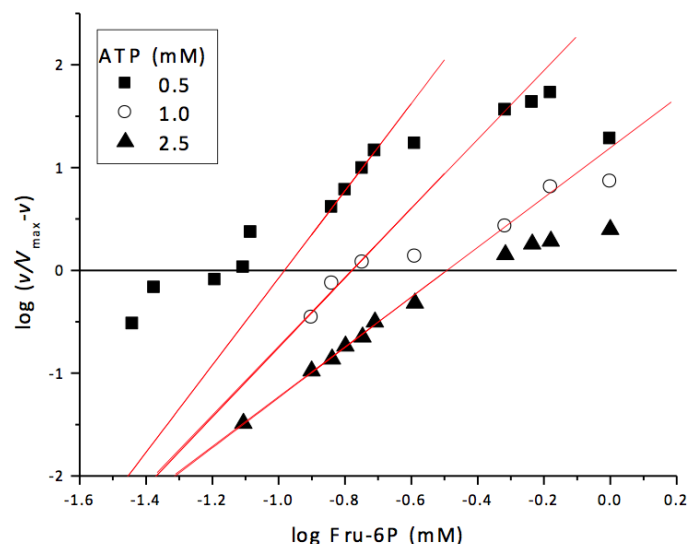


Fig. 2. Gráfico de Hill ($\log (v/V_{\max} - v)$ vs $\log (\text{Fru-6P})$).

Una forma de calcular el número aproximado de sitios es realizando un gráfico de Hill (Figura 2). En la figura 2 se graficó el $\log (v/[V_{\max} - v])$ vs $\log (\text{Fru-6P})$ a diferentes concentraciones de ATP, donde la $n = 2.4$. Puesto que "n" representa un número aproximado del verdadero número de sitios que interactúan, el valor cercano a 2 se pueden interpretar de dos maneras: que la enzima tiene dos sitios catalíticos con alta cooperatividad, o que hay cuatro sitios catalíticos con baja cooperatividad. Se ha descrito que en células de mamífero la PFK-1 es un homó o heterotetrámero (Moreno-Sánchez et al, 2012). Es importante mencionar que para calcular la pendiente se consideraron solo los puntos entre 0.12-0.26 mM de Fru-6P, debido a que a muy bajas concentraciones de sustrato la velocidad ya no es lineal debido a que la Fru-6P puede unirse a sitios reguladores no catalíticos antes de unirse a los sitios catalíticos. Sin embargo, a concentraciones altas también es posible encontrar desviaciones de la linealidad, debido a la dificultad para detectar

pequeños cambios en la velocidad conforme se incrementa la concentración de sustrato o a que los sitios catalíticos poseen afinidades diferentes (Segel, 1975).

Para determinar la afinidad del sitio alostérico por el ATP se puede utilizar la ecuación de Búc para inhibidores alostéricos (ecuación 3) o activadores alostéricos (ecuación 4). En el gráfico de Búc (Fig. 3) se observa que a partir de la intersección en el eje de las abscisas se puede obtener la constante de disociación del sitio alostérico. El ATP inhibió con una $K_i = 0.95$ mM, mientras que la afinidad por ATP fue mayor ($K_{sATP} = 0.1-0.34$ mM), obtenida a partir del regráfico de $1/(L\alpha)^{1/n}$ vs $[S]$, ver figura 4 y ecuación 3a. La constante de transición alostérica fue $L=1.66$, lo que indica que la abundancia de ambos estados (T y R) es muy similar.

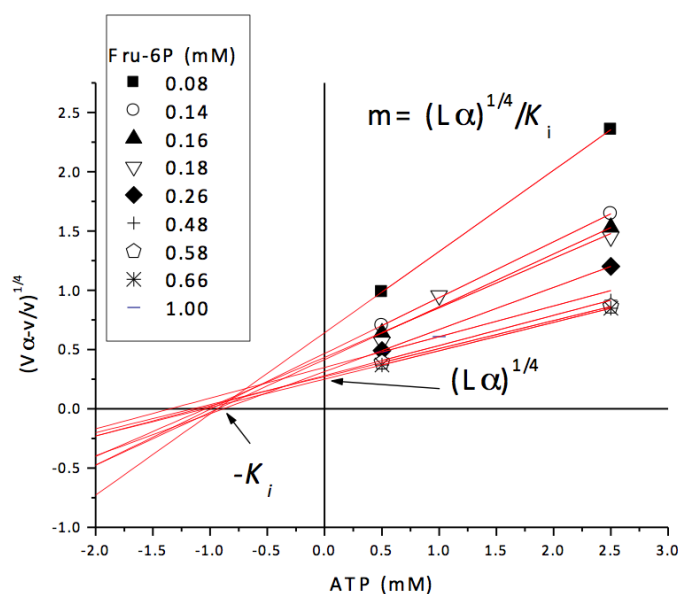


Fig. 3. Gráfico de Búc.

En el gráfico de Horn Börnig (figura 5) es posible calcular el número aproximado de subunidades "n" a partir de la pendiente de cada línea recta. En este caso, un valor de $n = 1.93$ sugiere que esta enzima puede ser un tetrámero, en concordancia con los resultados de la gráfica logarítmica de Hill (Fig. 2). La constante de transición alostérica determinada a partir de la ordenada al origen de la recta en ausencia de efector fue $L = 3.04$ y $L' = 270$ y 140 para 1.0 y 2.5 mM de ATP respectivamente. Los inhibidores incrementan la constante alostérica efectiva de L a L' , lo que hace que la línea recta se desplace por encima y de forma paralela a la línea control.

Al analizar el efecto alostérico del ATP sobre

la actividad de la PFK-1L, mediante el ajuste no lineal a partir de la ecuación de enlazamiento exclusivo (ecuación 5) utilizando el programa Origin 5.0 (Fig. 6), se observa como el comportamiento hiperbólico de las curvas disminuye a partir de 1.0 mM de ATP. A pesar de que el ATP es un potente inhibidor alostérico para la PFK-1, es difícil observar el comportamiento sigmoide de la curva de velocidad en presencia del ATP debido a que la actividad de esta enzima se determinó utilizando un buffer de reacción que contenía K^+ y NH_4^+ (potentes activadores alostéricos de la PFK-1L) (Moreno-Sánchez et al., 2012). Se ha descrito que el ATP a bajas concentraciones actúa como sustrato mientras que a concentraciones altas se puede unir a un sitio no catalítico (inhibidor alostérico), causando un cambio conformacional que impide la catálisis. La inhibición de la PFK-1L por ATP tiene un sentido fisiológico debido a que la función principal de la glucólisis es la producción de ATP, es decir el flujo glucolítico se regula por la velocidad de producción y consumo de ATP (Reed et al., 2010).

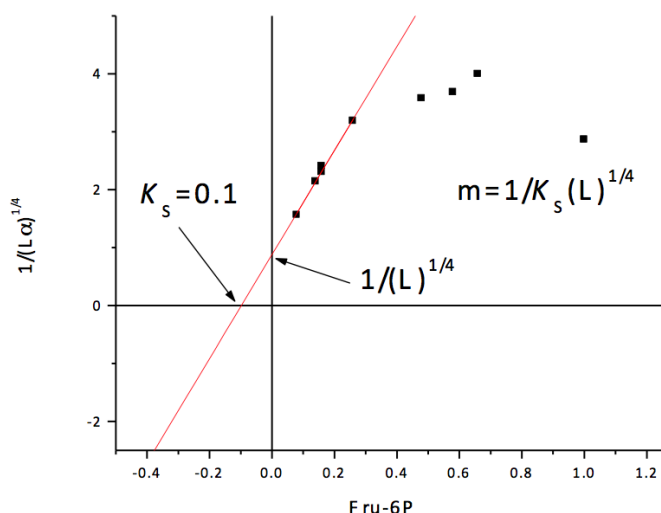


Fig. 4. Regráfico de $1/(L\alpha)^{1/4}$ vs $[Fru-6P]$ para la obtención de K_s y L .

El efecto de la $[Fru-2,6BP]$ (un activador alostérico) sobre la PFK-1, se puede analizar a partir de la curva de velocidad (Fig. 7), donde se observa que esta enzima presenta un comportamiento hiperbólico; la presencia de $5 \mu M$ de Fru-2,6BP lleva al mínimo la cooperatividad de la PFK-1L (donde $n=1$). Esto correlacionó con los datos obtenidos por ajuste lineal mediante la ecuación de Hill y por ajuste no lineal utilizando la ecuación de enlazamiento exclusivo (Figuras 7 y 8). En la figura 8, se graficó $\log(v/V_{max}-v)$ vs $\log(Fru-6P)$ en

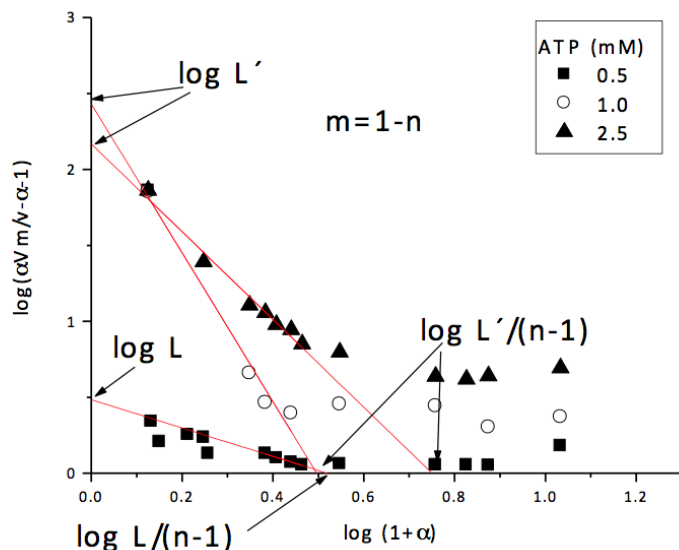


Fig. 5. Gráfico de Horn-Börnig. $\log(\alpha V_{max}/v - \alpha - 1)$ vs $\log(1 + \alpha)$ con diferentes concentraciones de inhibidor.

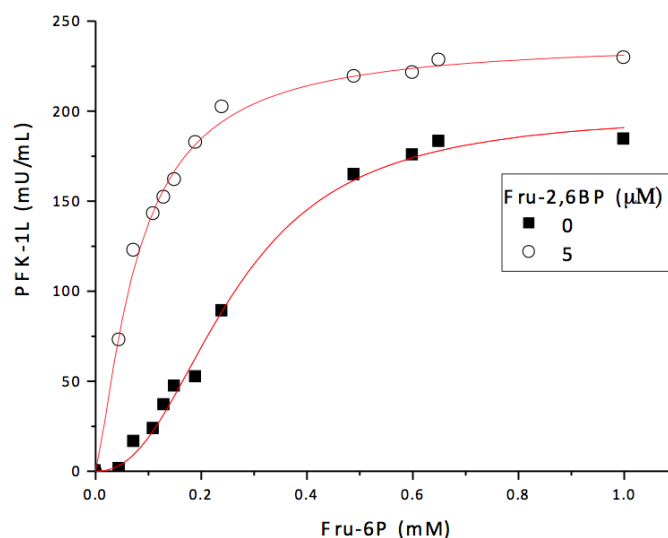


Fig. 7. Efecto de fru-2,6BP sobre la actividad de PFK-1L a varias concentraciones de Fru-6P a pH 7.0 y 2.5mM ATP. Los valores se ajustaron a la ecuación de enlazamiento exclusivo.

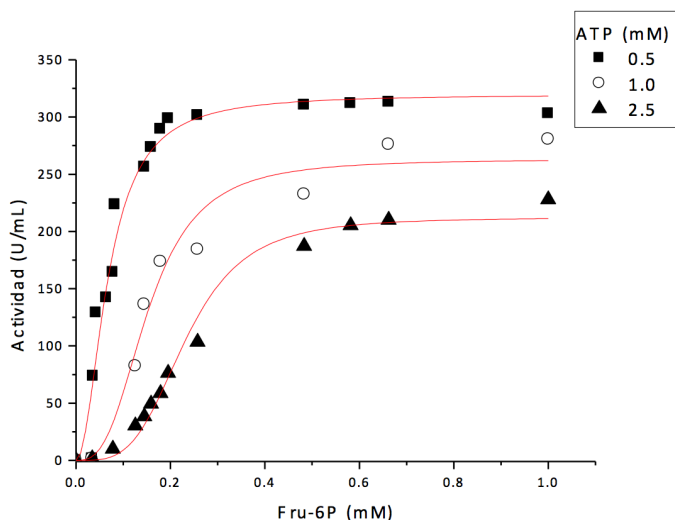


Fig. 6. Efecto del ATP sobre la actividad de PFK-1L a diferentes concentraciones de Fru-6P a pH 7.0. Los valores se ajustaron a la ecuación de enlazamiento exclusivo.

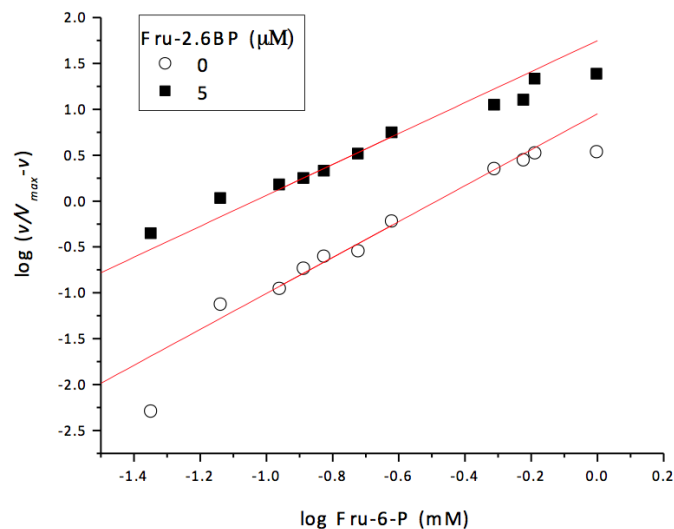


Fig. 8. Gráfico de Hill, $\log(v/V_{max} - v)$ vs $\log(\text{Fru-6P})$ en presencia y ausencia de Fru-2,6BP.

ausencia y presencia de [Fru-2,6BP] para conocer el valor de "n". Se determinó que $n = 1.66$; esto no significa que la enzima no sea un tetrámero, sino que los activadores en la mezcla de reacción minimizaron la cooperatividad de la PFK-1L.

Para determinar la afinidad de la Fru-2,6-BP por el sitio alostérico se puede utilizar la ecuación de Bú para activadores alostéricos (ecuación 4). En el gráfico de Bú (Fig. 9) la intersección en el eje

de las abscisas indica la constante de disociación para el sitio alostérico. La K_A fue de 2.38 μM. Al realizar el regráfico de $1/(L\alpha)^{1/4}$ vs [S] (Fig. 10), se puede obtener el valor de $L\alpha = 222$ a partir de la ordenada al origen y la $K_s = 0.34$ mM a partir de la abscisa al origen (ver ecuación 4a). A partir de este regráfico es posible obtener la constante de transición alostérica $L = 22.7$.

En el gráfico de Horn Börnig en presencia del

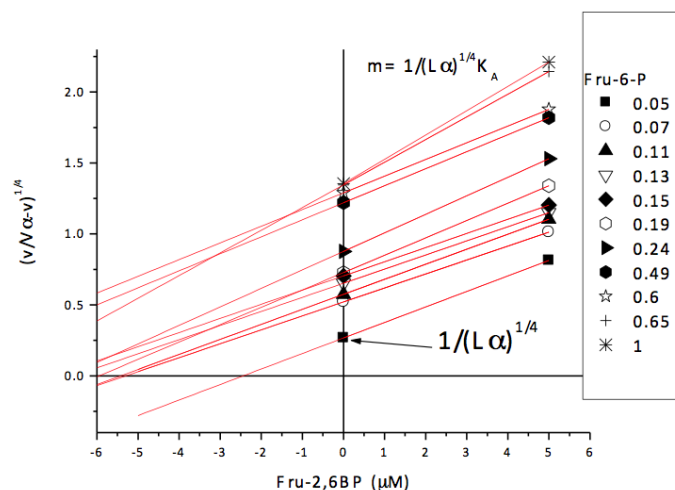


Fig. 9. Gráfico de Búc.

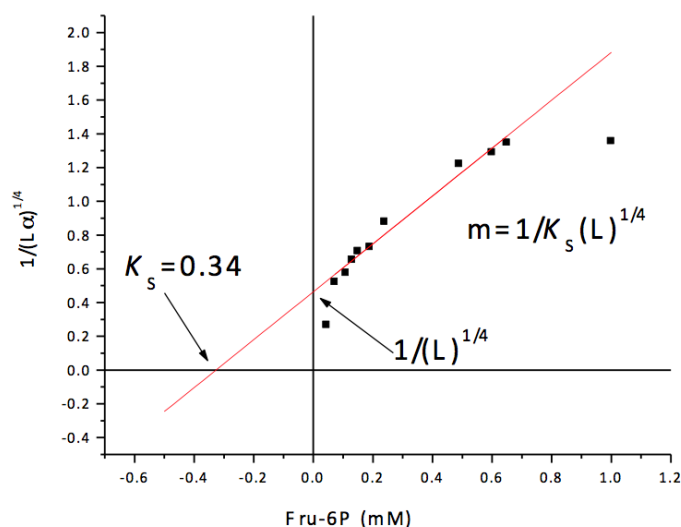


Fig. 10. Regráfico de $1/(L\alpha)^{1/4}$ vs $[Fru-6-P]$.

activador (Fig. 11) se obtuvo que $n=2.39$. Esto correlaciona con los valores obtenidos a partir del ajuste lineal. Se determinó la constante de transición alosterica $L=5$ a partir de la recta en ausencia de activador y $L'=1.28$ obtenida a partir de la recta en presencia de activador. Se ha descrito que los activadores disminuyen la constante de transición alosterica efectiva de L a L' , lo que hace que la línea recta se desplace por debajo y de forma paralela a la línea control. Es importante mencionar que la pendiente de estas rectas no fue de -3 como se esperaba teóricamente (porque la PFK-1L es un tetrámero $n=4$). Esto se debió quizás a los errores introducidos durante el proceso de transferencia de datos a partir de datos publicados

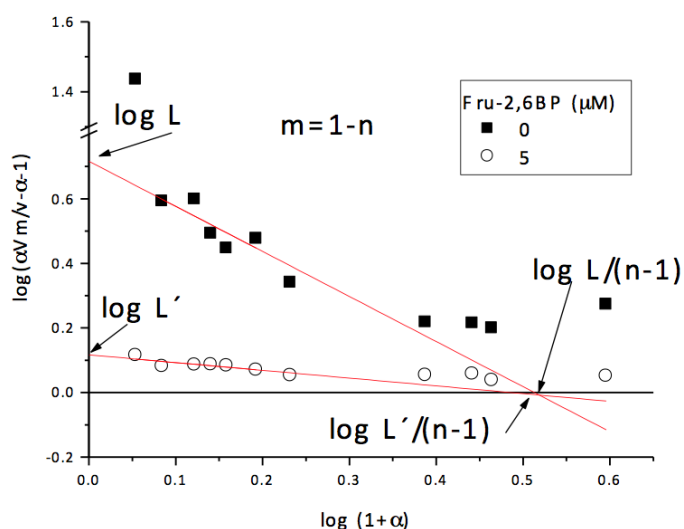


Fig. 11. Gráfico de Horn-Börnig. $\text{Log}(\alpha V_{max}/v - \alpha - 1)$ vs $\text{Log}(1 + \alpha)$ con diferentes concentraciones de activador.

previamente (Mediavilla et al, 2007), los cuales se digitalizaron usando el software WinDig 2.5. Estos errores pueden interferir en los cálculos y causar la dispersión de datos, sobre todo cuando los valores de $\text{log}(1 + \alpha)$ son muy bajos o muy altos.

CONCLUSIONES

En este trabajo se determinaron los parámetros cinéticos para la enzima alosterica PFK-1L de *Sparus aurata*, en presencia de ATP (inhibidor alosterico) o Fru-2,6BP (activador alosterico). Se utilizaron diferentes métodos mediante ajuste lineal (Hill, Búc, Horn Börnig) y no lineal (utilizando la ecuación de Hill y la ecuación de enlazamiento exclusivo para inhibidores y activadores). Los parámetros cinéticos obtenidos bajo estas diferentes aproximaciones se resumen en la Tabla III, donde se puede observar que la K_s para el ATP está en el intervalo μM , por lo que con 0.5 mM ya se observa inhibición. Por esto el ensayo enzimático debería realizarse con concentraciones menores de ATP que no sean inhibitorias.

Con base en el análisis cinético realizado, es posible concluir que ningún método lineal por sí solo permite obtener todos los parámetros cinéticos K_s , n , L , K_i , K_A . Mientras que el ajuste no lineal permitió obtener todos los parámetros cinéticos con valores muy similares a los obtenidos con los diferentes métodos gráficos (ajuste lineal) excepto para la K_s para ATP y el valor de L , en donde los distintos métodos dan valores muy diferentes,

Tabla III

Parámetros cinéticos obtenidos a partir de los diferentes métodos por ajuste lineal y ajuste no lineal

Parámetros cinéticos	Ajuste lineal				Ajuste no lineal
	Lineal	Hill	Búc	Horn Börnig	Enlazamiento exclusivo
V_{max} (mU/mg)	63.2				41.4-63.8
K_S (mM) ATP	0.34		0.1-0.34		0.005-0.006
K_i (mM) ATP			0.95		0.9
K_A (μ M) Fru-2,6BP			2.38		2.38
L		1.6-1.98	1.66	3-5	116
n		1.6-2.4		1.93-2.39	2.01

esto probablemente se debe a que por simplicidad el análisis se realizó utilizando consideraciones de equilibrio rápido y quizás esto no se aplique del todo a una enzima alostérica, por lo que para fines experimentales debería realizarse otro tipo de análisis complejos.

Aunque el análisis cinético sugiere que la PFK-1L es un tetrámero, con esto no es posible concluir el estado oligomérico de la enzima, por lo cual sería conveniente realizar experimentos de exclusión molecular para determinar la estructura de la enzima.

Finalmente, es importante mencionar que el interés por estudiar enzimas como la PFK-1L de *Sparus aurata*, radica en identificar el posible papel que esta enzima tiene en la adaptación metabólica frente a un cambio de dieta (proteínas por carbohidratos). Por lo que analizar sus características cinéticas y conocer sus moduladores alostéricos podría permitir modificarla ya que puede ser un punto de control metabólico en la glicolisis y con ello favorecer el desarrollo de fármacos (activadores alostéricos). En este caso podría ofrecer alternativas terapéuticas para mejorar el tratamiento de la diabetes II en mamíferos.

REFERENCIAS

1. Mediavilla D, Metón L, Baanante IV (2008) Purification and Kinetic Characterization of 6-Phosphofructo-1-kinase from the Liver of Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*). J Biochem 144, 235-244.
2. Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sánchez R (2006) Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. FEBS Journal 273, 1975-1988.
3. Sharma Bechan (2011) Kinetic Characterization of Phosphofructokinase Purified from Setaria cervi: A Bovine Filarial Parasite. Enzyme Research. Vol. 11 doi:10.4061/2011/939472.
4. Horn y Börnig (1969) Analyses of kinetic data of allosteric enzymes by a linear plot. 3(5):325,329
5. Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Quezada H, Encalada R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E (2012) Phosphofructokinase type 1 kinetics, isoform expression, and gene polymorphisms in cancer cells. J Cell Biochem. 113(5):1692-703.

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.