

S. 147845

# INTRODUCCIÓN


## A LA

# FÍSICA BIOLÓGICA

1

*Leopoldo García-Colín Scherer*  
*Leonardo Dagdug*  
*Michel Picquart*  
*Edgar Vázquez*

*Coordinadores*

 COORDINACIÓN DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA



EL COLEGIO NACIONAL  
México, 2010

QH505  
I57

Introducción a la física biológica / Leopoldo García-Colín Scherer, Leonardo Dagdug, Michel Picquart, Edgar Vázquez, coordinadores -- México : El Colegio Nacional, 2010  
3 v.  
ISBN: 978-607-7630-77-7  
1. Biofísica. I. García-Colín Scherer, Leopoldo. ed. II. Dagdug, Leonardo, ed. III. Picquart, Michel, ed. IV. Vázquez, Edgar, ed.

QH505

I5.97

V.1

W.2818D5

Coordinación Editorial: Rosa Campos de la Rosa

Primera edición: 2010

D. R. © 2010. EL COLEGIO NACIONAL  
Luis González Obregón núm. 23, Centro Histórico  
C. P. 06020, México, D. F.  
Teléfonos 57 89 43 30, 57 02 18 78; Fax 57 02 17 79

ISBN: 978-607-7630-77-7

Impreso y hecho en México  
*Printed and made in Mexico*

Correo electrónico: [colnal@mail.internet.com.mx](mailto:colnal@mail.internet.com.mx)  
Página: <http://www.colegionacional.org.mx>



## CONTENIDO

Prólogo .....	ix
CAPÍTULO 1	
Elementos de termodinámica clásica para biólogos <i>Leopoldo García-Colín Scherer</i> .....	1
CAPÍTULO 2	
El origen de la vida: entre el determinismo físico y la contingencia histórica <i>Antonio Lazcano Araujo</i> .....	57
CAPÍTULO 3	
El DNA <i>Pedro Miramontes, Arturo Becerra</i> .....	77
CAPÍTULO 4	
Estructura y función del ARN <i>Juan Miranda Ríos</i> .....	113
CAPÍTULO 5	
La variabilidad genómica y sus implicaciones en el cuidado de la salud <i>Gerardo Jiménez Sánchez, Enrique Hernández Lemus, Alfredo Hidalgo-Miranda</i> .....	149
CAPÍTULO 6	
Estructura y función de proteínas <i>Alfredo Torres Larios, Marietta Tuena de Gómez-Puyou, Armando Gómez Puyou</i> .....	187

CAPÍTULO 7	
Las interacciones fundamentales en la estructura tridimensional de las proteínas y otras biomoléculas	
<i>Edgar Vázquez Contreras</i> .....	237
CAPÍTULO 8	
Estudio de las rutas de (des)plegamiento de proteínas usando la computadora como microscopio molecular	
<i>Nina Pastor Colón, D. Alejandro Fernández Velasco</i> .....	279
CAPÍTULO 9	
Bioinformática	
<i>Arturo Rojo Domínguez</i> .....	317

## PRÓLOGO

Ahora que se ha empezado a estudiar con seriedad a la naturaleza nos damos cuenta de la amplitud de las preguntas, de la distancia a recoger para tratar de contestarlas. El gran peligro para la humanidad no es el desarrollo del conocimiento, es la ignorancia.

François Jacob

Probablemente la primera evidencia que se tiene de la relación entre la física y la biología inició con los experimentos del italiano Luigi Galvani cuando, en 1780, ideó y construyó una máquina electrostática formada por dos placas de metales y fluidos extraídos de una rana. Más adelante él y su ayudante Giovanni Aldini demostraron que, aplicando una pequeña corriente eléctrica a la médula espinal de una rana descerebrada, se producían contracciones musculares en los miembros de la misma. Estas descargas podían lograr que las ancas, incluso separadas del cuerpo, se contrajeran de la misma forma que cuando el animal estaba vivo. A partir de ese momento, los sistemas biológicos se han estudiado con mucho interés desde el punto de vista físico.

A mediados del siglo XIX surgieron dos grandes teorías sobre la evolución de los sistemas naturales en el tiempo. Por una parte la teoría cinética de los gases (creada por Ludwig Boltzmann) contempla una naturaleza en constante degradación hacia la muerte, en forma de desorden.

Esta visión de la evolución de los sistemas naturales, inspirada por la segunda ley de la termodinámica, contrasta considerablemente con la segunda teoría basada en el paradigma asociado con los sistemas biológicos, crecientemente complejos, especializados y organizados a lo largo del tiempo, como lo describe Charles Darwin.

Además la fenomenología de muchos sistemas naturales muestra que existen estructuras coherentes fuera del equilibrio termodinámico como las células de convección, las reacciones químicas autocatalíticas y la vida misma. Los sistemas vivos exhiben un alejamiento del desorden y en equilibrio, lo que se traduce en estructuras altamente organizadas que utilizan grandes cantidades de energía para mantenerse.

Boltzmann reconoció la contradicción aparente entre la muerte térmica del universo y la existencia de sistemas vivos que crecen, adquieren complejidad y evolucionan. Postuló que el gradiente de energía solar impulsa la vida y todos sus procesos (Boltzmann, L., *The second law of thermodynamics*, 1886, reimpresso en *Ludwig Boltzmann, theoretical physics and philosophical problems*, B. McGuinness y D. Reidel, editores, Nueva York, 1974).

Las ideas de Boltzmann y posteriormente las de Max Delbrück, fueron las principales fuentes intelectuales de motivación de *¿Qué es la vida?*, el libro de Erwin Schrödinger en el que intentó agrupar los procesos fundamentales de la biología, la física y la química. Schrödinger observó que ciertos sistemas, en particular los vivos, parecían desafiar la segunda ley de la termodinámica clásica. Sin embargo, reconoció que los sistemas vivos no son cajas cerradas adiabáticas, sino sistemas abiertos capaces de interactuar por medio de materia y energía con su entorno. También recalcó que un organismo se mantiene vivo en su estado altamente organizado a base

de importar energía externa de alta calidad y degradarla para sostener su compleja estructura y organización. Este trabajo se convirtió en uno de los libros más influyentes en la historia de la ciencia y jugó un papel primordial entre los fundadores de la biología molecular. *¿Qué es la vida?* hizo época no porque ofreciese un enfoque útil para la comprensión del fenómeno en sí, sino porque inspiró nuevas líneas de pensamiento, entre ellas la física biológica.

La creación de la biología molecular es atribuida a físicos que formaron vías experimentales radicalmente nuevas. Nació de decisiones individuales tomadas por un pequeño número de científicos entre el final de los años treinta y principios de los cincuenta del siglo xx. Los campos de trabajo de estos investigadores eran muy diversos: biología, física, medicina, microbiología, química, cristalografía, etcétera. En el centro del estudio del mundo viviente se encontraban las preguntas planteadas por la genética; podríamos decir que inventaron una nueva biología. La historia de la biología molecular puede servir de modelo para entender cómo se estructura una investigación original, independientemente de las aplicaciones eventuales que de ella se desprendan.

Primero fue Max Delbrück, físico teórico de la escuela de Gotinga quien, inspirado por el principio de complementariedad de Niels Bohr, decidió investigar los detalles moleculares de la herencia. Posteriormente Linus Pauling, físico de la escuela de Arnold Sommerfeld, persiguió una comprensión más profunda de la naturaleza de las proteínas, enfocándose en elucidar los ejecutores microscópicos de las células vivas o las moléculas del fenotipo. En este proceso descubrió elementos estructurales esenciales, tendiendo así un puente entre la química y la biología, idea que influyó en Francis Crick

y James Watson para llevarlos a descubrir la estructura de doble hélice del ADN en 1953 y, como consecuencia Crick, dedujo el modo en el que la información genética podía almacenarse y transferirse de generación en generación, enunciando el denominado "dogma central de la biología molecular": ADN → ARN → proteína, que hoy es incluido en los flujos de la información genética de los seres vivos.

En esa misma década Max Perutz, quien se encontraba trabajando en el Laboratorio Cavendish bajo la dirección de Lawrence Bragg aplicando la técnica de difracción de rayos X a una proteína, encontró la estructura de la hemoglobina, todo un reto experimental para la época. De esta forma y muchos años después de haber iniciado su proeza explicó por primera vez, junto con John Kendrew, el diseño detallado de una máquina biomolecular. Es importante mencionar que tanto Kendrew y Perutz como Watson y Crick recibieron el Premio Nobel en el mismo año (aunque en áreas diferentes) por dilucidar las moléculas del fenotipo y genotipo, respectivamente.

En la actualidad tenemos un amplio conocimiento del diseño molecular de las células, incluyendo los detalles de los procesos moleculares que se encuentran en la base de las funciones celulares o del metabolismo. Por una parte, tenemos idea de las repercusiones que producen tanto las perturbaciones, como las averías de tales funciones, lo que se expresa en los más diversos síndromes clínicos; y por otra, el modo en que algunos organismos como virus, bacterias, protozoarios y hongos parásitos modifican el ciclo vital de otros organismos. De hecho, hemos podido ir aún más lejos en el entendimiento de la regularización de estos procesos vitales, hasta el punto de alterar permanentemente su programa genético y construir clones, híbridos, transgénicos, etcétera.

Uno de los ejemplos más claros del éxito de la fusión entre la física y la bioquímica lo proporciona la industria farmacéutica moderna en la que se explota el conocimiento detallado de la biología molecular y de los procesos de difusión, en sistemas confinados para el diseño y liberación controlada de drogas.

En los últimos veinte años en México la física biológica ha tomado un auge de dimensiones impredecibles. Es debido al gran interés en el estudio de esta disciplina de vanguardia que se consideró necesaria la edición de un libro de texto en español. La tarea se simplificó al existir investigadores de altísimo nivel dispuestos a contribuir con su conocimiento para realizarlo. Afortunadamente estos elementos se conjuntaron adecuadamente en tiempo y forma para dar lugar a esta obra.

El contenido de los tres tomos que la comprenden pretende abarcar un amplio espectro de los temas de física biológica que se desarrollan en diversas instituciones de nuestro país. Los temas van desde la termodinámica de sistemas biológicos hasta la evolución, pasando por las máquinas moleculares, el análisis no lineal de series de tiempo, la cristalografía, el código genético, la estructura y función del ADN y de las proteínas. También se incluye información sobre las interacciones entre las biomoléculas, la difusión, etcétera. Los coordinadores estamos seguros que este texto será de gran utilidad para cualquier lector interesado en alguna de sus ramas o de la biofísica en general. Esperamos que estos tres tomos contribuyan a consolidar los cimientos del desarrollo de las biociencias en México. La variedad y profundidad de los capítulos constituyen una clara muestra del grado de experiencia de los investigadores participantes en los diversos temas y son la justificación de su publicación.

Los coordinadores y autores participantes en este proyecto agradecen profundamente a Aline y Cristina Ortiz-Herrera su ayuda en la formación, redacción, edición, dibujo y diseño, tanto del texto, como de las ilustraciones de esta obra. Asimismo expresamos nuestro agradecimiento a El Colegio Nacional por el apoyo brindado para hacer posible su publicación.

LOS COORDINADORES

México, D. F., Mayo de 2010

## CAPÍTULO 1 ELEMENTOS DE TERMODINÁMICA CLÁSICA PARA BIÓLOGOS

LEOPOLDO GARCÍA-COLÍN SCHERER\*  
Miembro de El Colegio Nacional

### 1. INTRODUCCIÓN

Hace ya setenta y seis años que en su revolucionario y excitante libro *¿Qué es la vida?*, el insigne físico austriaco Erwin Schrödinger planteó una pregunta que hoy en día es la base de lo que podríamos llamar la *física biológica*, a saber, ¿cómo los eventos en el espacio y en el tiempo, que tienen lugar dentro de las fronteras espaciales de organismos vivos, pueden ser explicados por las leyes de la física y la química? No es mi intención disertar aquí sobre el magnífico libro de Schrödinger; eso es algo que todo estudiante realmente interesado en la biología debería hacer por sí mismo. Mi propósito es el de proporcionar los conceptos más fundamentales que se requieren para abordar la pregunta con toda seriedad.

Un ser vivo es también un conjunto de átomos que, obedeciendo las leyes físicas y químicas a través de meca-

\* Profesor Emérito Distinguido de la Universidad Autónoma Metropolitana  
lgcs@xanum.uam.mx

nismos de interacción, a la fecha todavía no bien dilucidados, son los responsables de los mecanismos vitales que constituyen el proceso llamado vida. Debido al enorme número de átomos implicados, van a predominar los aspectos estadísticos de las leyes que constituyen la rama de la física hoy conocida como física estadística y, en este caso, sería más adecuado emplear el término fisicoquímica estadística. Así, las características fenomenológicas o macroscópicas de los sistemas vivos deben estar gobernadas por las leyes de la termodinámica de los sistemas abiertos, esto es, aquellos que intercambian masa con su alrededor. Obviamente, un sistema vivo no es un sistema aislado, tampoco un sistema en equilibrio termodinámico; de manera que dicha termodinámica debe ser la que gobierna a los llamados procesos fuera de equilibrio o irreversibles.

Por último, desde el punto de vista microscópico, es la mecánica estadística de los procesos irreversibles la que se encarga de explicar estos procesos fuertemente arraigados en la relación entre el ya conflictivo concepto de entropía, con el concepto matemático de lo que es una probabilidad. Para abordar estos temas de manera clara y exhaustiva se requeriría de todo un tratado sobre la materia.

El objetivo de este capítulo es, además de presentar los conceptos básicos de la termodinámica de sistemas abiertos en equilibrio, absolutamente necesarios para comprender su extensión a problemas fuera del equilibrio; trataremos de manera muy superficial la termodinámica fuera de equilibrio y la interpretación probabilística de la entropía. Con esta herramienta el lector podrá abordar aspectos más profundos de estos temas en la literatura especializada.

## 2. CONCEPTO BÁSICOS. SISTEMAS CERRADOS

Un sistema termodinámico es cualquier componente del mundo macroscópico, esto es, observable y caracterizado por dos componentes: sus atributos y sus restricciones. Los primeros son aquellos parámetros perceptibles a nuestros sentidos y fáciles de medir en el laboratorio: presión, volumen, magnetización, índice de refracción, polarización, etcétera. Las restricciones son geométricas, mecánicas y térmicas; las primeras definen el "tamaño" del sistema; las segundas la influencia de dispositivos que pueden intercambiar energía mecánica sobre él, tales como pistones, campos eléctricos y magnéticos, tensores, etcétera, y los térmicos, aquellos que permiten alterar el grado de calentamiento (o enfriamiento) del mismo, como paredes aislantes o conductoras (metálicas). Al elegir el sistema, el observador especifica a voluntad cuáles son las restricciones que quiere imponer. Cada restricción implica la naturaleza del atributo que se ve afectado por ella y el número de restricciones establece el número de parámetros asociados a dichos atributos, que son independientes.

Así, un gas en un cilindro con un pistón fijo en cierta posición es un sistema tridimensional que ocupa un volumen dado y, si el recipiente que lo contiene está fijo en el espacio y rodeado de un aislante, existen tres restricciones y los parámetros asociados a ellos son la presión  $p$ , el volumen  $V$  y la energía total, que llamaremos  $E$ . Si permitimos que el pistón se desplace, inducimos un intercambio de energía mecánica con los alrededores, lo que provoca un proceso y el atributo  $p$  va a quedar determinado por  $E$  y  $V$ . En general, la remoción de una restricción induce un proceso, se pierde un grado de libertad y el sistema intercambia trabajo, mecánico en este caso,

con sus alrededores. Si, por otra parte, mantenemos los valores que especifican a los atributos, constantes en el tiempo y con el mismo valor en cualquier punto del sistema, decimos que el sistema se encuentra en equilibrio termodinámico. En sistemas abiertos, para los cuales las paredes (o fronteras) que los rodean pueden ser permeables o semipermeables a la materia, esto es, permiten transferencia de masa, el estado de equilibrio termodinámico debe involucrar la condición de que la composición química del sistema sea la misma en cada punto y no varíe con el tiempo.

Con este pequeño arsenal de ideas podemos entrar al aspecto más fundamental de este estudio: discutir las leyes fundamentales que gobiernan a los sistemas termodinámicos cuando están en equilibrio. Estas leyes tienen un origen un tanto singular; las llamadas *primera* y *segunda* se descubrieron en el siglo XIX y la *ley cero*, que por lógica debió haber sido la primera, fue formulada con toda precisión hasta 1930, casi un siglo después que las otras dos.

La ley cero de la termodinámica que debe entenderse, así como las otras dos, como un hecho empírico, establece que todo sistema termodinámico en equilibrio, mecánico y químico, alcanza siempre su estado de equilibrio térmico. Más aún, dos o más sistemas en contacto entre sí a través de paredes conductoras o diatérmicas, alcanzan el equilibrio térmico mutuo y se dice entonces que el atributo común que los caracteriza es su *temperatura*. La temperatura, un parámetro de todos conocido, se mide utilizando termómetros calibrados por reglas que no discutiremos aquí. Las escalas termométricas más conocidas son la Fahrenheit, la Celsius y la escala Kelvin. La primera le asigna por convención  $32^\circ$  al punto de congelación del agua y  $212^\circ$  a su punto de ebullición. La escala Celsius les asigna valores cero y cien, de manera que un grado

Fahrenheit corresponde a 1.8 grados centígrados, y si llamamos  $\theta$  a la temperatura

$$\theta_F = \frac{9}{5}\theta_C + 32$$

o

$$\theta_C = \frac{5}{9}(\theta_F - 32).$$

La escala Kelvin tiene una convención diferente. Se representa por  $T$ , la cual se toma de manera que

$$T = \theta + 273.15 \text{ (K)}.$$

Para una discusión más detallada del origen y uso de estas escalas referimos al lector a la literatura. Baste saber aquí que la temperatura es un parámetro intrínseco a todo sistema y que especifica su estado de equilibrio térmico.

Quando dos o más sistemas tienen la misma temperatura se dice que están en equilibrio térmico entre sí. La ley cero establece además que, para todo sistema termodinámico, existe una relación funcional entre su temperatura y los parámetros (que a partir de ahora llamaremos variables termodinámicas) que se hayan elegido como independientes. Por ejemplo, para un gas encerrado en un cilindro a presión  $p$  y con volumen  $V$ , sin paredes diatérmicas, existe la relación funcional

$$T = T(p, V) \quad (1)$$

llamada "ecuación de estado". Por comodidad usaremos de aquí en adelante la escala Kelvin (llamada también escala termodinámica) y a la temperatura la designaremos como  $T$ . Es sumamente importante entender que la ley cero establece la existencia de la ecuación de estado,



mas no su forma analítica. Esta última se obtiene, o bien del experimento, o bien de teorías microscópicas de la materia. Así, por ejemplo para el llamado gas ideal, representado en la naturaleza por gases nobles a muy bajas densidades, se cumple la ecuación de Boyle-Mariotte-Guy Laussac, para una mol de gas

$$pV = RT \quad (2)$$

donde  $R = 8.315 \times 10^3$  julios/kg-mol K, es la llamada constante universal de los gases. Para otros sistemas hay ecuaciones análogas, pero rara vez aparecen en el estudio de sistemas químico-biológicos, así que no las tocaremos aquí.

Es evidente de la discusión anterior que el concepto de temperatura es igualmente aplicable a sistemas cerrados o abiertos, el que haya o no transferencia de masa no afecta el concepto de equilibrio térmico. La temperatura  $T$  es una variable *intensiva*, esto es, no depende del tamaño del sistema. Esto no siempre ocurre así con otras variables, de manera que tenemos que proceder con mucho cuidado. Por ejemplo, el volumen es una *variable extensiva*.

Consideremos primero un sistema cerrado y aislado térmicamente de sus alrededores, esto es, sus paredes son aislantes perfectos; ahora supongamos que le suministramos cierta cantidad de trabajo, mediante el cual cambiará de su estado inicial  $i$  a un estado final  $f$ . Podemos pensar que el trabajo total que se suministra al sistema se puede representar por una suma de contribuciones infinitesimales  $(dW)_{ad}$ , de manera que el trabajo total suministrado a dicho sistema se puede representar como

$$+\int_i^f (dW)_{ad}$$

el signo más se introduce simplemente por convención (es negativo si el sistema es el que realiza el trabajo). Está

claro que la suma constituye cierta energía suministrada al sistema. Ahora bien, si éste no se mueve, esto es, no cambia su energía cinética, no se eleva ni desciende, no cambia su energía potencial, ¿qué le sucede a esta energía? Si aceptamos como válido el principio de conservación de la energía, ésta tiene que transformarse en otra forma de la misma. La primera ley de la termodinámica postula que todo sistema termodinámico posee un atributo llamado su *energía interna*, representada por  $U$ , tal que

$$\Delta U \equiv U_f - U_i = +\int_c^f (dW)_{ad} = +(\Delta W)_{ad} \quad (3)$$

Es claro que  $U$  está definida hasta una constante aditiva arbitraria, pero esto es intrascendente ya que siempre medimos diferencias de energía. En otras palabras, la primera ley postula que:

“Todo sistema termodinámico posee un atributo caracterizado por la variable  $U$ , tal que si se suministra al sistema una cierta cantidad de trabajo en forma adiabática,  $\Delta U = +(\Delta W)_{ad}$ ”.

¿Y si el mismo cambio  $\Delta U$  se produce, por ejemplo, calentándolo con un mechero o poniéndolo en contacto con un cuerpo más caliente hasta que se llegue al mismo estado final  $f$ ? La respuesta es de todos conocida: existe una forma de energía no mecánica llamada calor y denotada por  $Q$ , tal que  $(\Delta U) = Q$ . Así pues, en general, la ecuación (3) se puede escribir como

$$\Delta U - W = Q = W_{ad} - W \quad (4)$$

“La energía total se conserva cuando el calor se toma en cuenta”. Éste es el enunciado más común de la primera ley pero, cuidado, porque para escribir la ecuación (4) se requiere primero haber definido  $\Delta U$ .

Finalmente, está claro que por ser  $U$  una variable termodinámica extensiva, se garantiza la existencia de las ecuaciones,

$$U = U(T, V), \quad U = U(T, p), \quad \text{etcétera}, \quad (5)$$

con la misma propiedad que la ecuación (1). Para un gas (o sistema en general) ideal, se sabe que

$$U = C_V T + U_0. \quad (6)$$

donde  $C_V$  es la llamada capacidad calorífica a volumen constante. Las ecuaciones (5) y (6) son las llamadas ecuaciones de energía del sistema y, en general, se dice que un sistema es ideal si y solamente si  $U = U(T)$ .

Antes de continuar y analizar la segunda ley para sistemas cerrados, conviene hacer un paréntesis. El análisis matemático de las ecuaciones de estado y de energía requiere de un proceso de transformación del sistema entre dos estados. Si ambos están separados por cantidades infinitesimales y la función correspondiente es continua entre ambos, podemos hacer uso del cálculo diferencial para calcular el incremento de la función respectiva. Esto no impone ninguna limitante a los resultados pues, mientras los estados inicial y final sean de equilibrio, el valor de la función es independiente del proceso. Es por ello que considerar en termodinámica procesos infinitesimales y cuasiestáticos o sea, infinitamente lentos, es extremadamente útil ya que al estudiar estados independientes del tiempo, el cómo se llegue a ellos es irrelevante. Veamos dos ejemplos:

a) Supongamos un fluido de una sola componente para el cual sabemos que la ecuación

$$p = p(V, T)$$

existe. Para un proceso infinitesimal y cuasiestático que aumente la presión de  $p$  a  $p + dp$ , si los incrementos en  $V$  y  $T$  son  $dV$  y  $dT$ , respectivamente,

$$dp = \left( \frac{\partial p}{\partial V} \right)_T dV + \left( \frac{\partial p}{\partial T} \right)_V dT. \quad (7)$$

Dos cantidades fáciles de medir en un fluido son su compresibilidad isotérmica  $\kappa_T$  y su coeficiente de expansión térmica  $\beta$ , definidos como,

$$\kappa_T = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial p} \right)_T \quad \beta = \frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p. \quad (8)$$

Por el teorema o relación cíclica del cálculo diferencial,

$$\left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p \left( \frac{\partial p}{\partial V} \right)_T \left( \frac{\partial T}{\partial p} \right)_V = -1 \quad (9)$$

y por lo tanto,

$$\left( \frac{\partial p}{\partial T} \right)_V = - \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p \cdot \left( \frac{\partial p}{\partial V} \right)_T^{-1} = \frac{\beta}{\kappa}$$

por las ecuaciones (8). La ecuación (7) se reescribe como,

$$dp = -\frac{1}{\kappa_T V} dV + \left( \frac{\kappa_T}{\beta} \right)^{-1} dT. \quad (10)$$

Si podemos conocer  $\kappa_T$  y  $\beta$  en un cierto intervalo de volúmenes y temperaturas,

$$\Delta p = p_f - p_i = - \int_{V_i}^{V_f} \frac{1}{\kappa_T V} dV + \int_{T_i}^{T_f} \left( \frac{\kappa_T}{\beta} \right)^{-1} dT.$$

Si experimentalmente nos dicen que  $\beta = 1/T$  y  $\kappa = 1/p$ , de la ecuación (10)

$$\int \frac{dp}{p} \equiv -\int \frac{dV}{V} + \int \frac{dT}{T}$$

o sea

$$pV = \text{constante } T.$$

Identificando la constante con  $R$ , obtenemos la ecuación (2).

Para las ecuaciones de la energía se puede hacer algo similar. Para un proceso infinitesimal y cuasiestático, el trabajo realizado por, o sobre, el sistema se puede escribir como

$$dW = \sum_i X_i dY_i, \quad (11)$$

donde, por analogía con la mecánica,  $X_i$  denota la *fuerza termodinámica* que es la variable termodinámica extensiva que produce un *desplazamiento generalizado* denotado por la variable extensiva  $Y_i$ . Así, si  $X_i = p$ ,  $Y_i = V$  (el signo menos se debe a que, a mayor presión, el volumen es menor); si  $X_i = H$ ,  $Y_i = \mathfrak{M}$  (magnetización);  $X_i = \tau$  (tensión),  $Y_i = L$  (longitud), etcétera. Nótese que todos los términos que aparecen en (11) deben tener unidades de energía y, además, la notación  $d$  implica que la diferencial correspondiente no es exacta, sino que depende del proceso. Así, para estos procesos la ecuación (4) puede reescribirse como

$$dU = dQ + \sum_i X_i dY_i. \quad (12)$$

La ecuación (12) es la forma diferencial más general para la primera ley de la termodinámica. Si nos restringimos a fluidos inertes,  $dW = pdV$  y por lo tanto,

$$dU = dQ - pdV, \quad (13)$$

una ecuación que será de mucha importancia en lo que sigue. Si  $U = U(V, T)$ ,

$$dQ = \left( \frac{\partial U}{\partial T} \right)_V dt + \left\{ \left( \frac{\partial U}{\partial V} \right)_T + p \right\} dV.$$

Para un proceso isométrico, esto es  $V = \text{constante}$ ,  $dV = 0$ , y por lo tanto,

$$\left( \frac{dQ}{dT} \right)_V = \left( \frac{\partial U}{\partial T} \right)_V \equiv C_V.$$

$C_V$ , la llamada capacidad calorífica a volumen constante. De aquí, si  $C_V$  es constante

$$U = C_V T + \text{constante},$$

que, como ya vimos, es precisamente la ecuación para la energía de un sistema ideal. Si el proceso a presión constante,

$$\begin{aligned} \left( \frac{dQ}{dT} \right)_p &= \left( \frac{\partial U}{\partial T} \right)_V + \left\{ \left( \frac{\partial U}{\partial V} \right)_T + p \right\} \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p \\ &= C_V + \left\{ \left( \frac{\partial U}{\partial V} \right)_T + p \right\} \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p \equiv C_p \end{aligned}$$

donde  $C_p$  es la capacidad calorífica a presión constante.

Para un gas ideal, por definición  $(\partial U/\partial V)_T = 0$  y por lo tanto, usando la ecuación (8) y el hecho de que  $\beta = (1/T)$  para un gas ideal, tenemos que

$$C_p - C_V = p \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p = \frac{pV}{T} = \nu R$$

para  $\nu$  moles de gas.

Si llamamos

$$C_p^* = \frac{C_p}{\nu} \quad \text{y} \quad C_V^* = \frac{C_V}{\nu},$$

donde  $\nu$  es el número de moles,

$$C_p^* - C_V^* = R, \quad (14)$$

la bien conocida relación entre los calores específicos molares de los gases ideales. Aunque hay múltiples aplicaciones de las ecuaciones de estado y de energía que el lector puede ahora consultar en cualquier texto de termodinámica clásica, veamos aplicaciones más afines a la biología. Si tomamos un proceso isométrico ( $V = \text{const.}$ ) en un fluido,  $dU = dQ_V = dQ_V$ ; esto es, el cedido por  $a$  al sistema no depende del proceso. Un ejemplo es una reacción química ocurriendo en un recipiente cerrado, donde el calor que se intercambia entre reactivos y productos depende de los estados inicial y final, no del mecanismo de la reacción. En muchas reacciones químicas es la presión la que permanece constante y en tal caso es deseable saber si el calor involucrado tiene o no la misma propiedad. La respuesta es afirmativa y fue descubierta en 1840 por el químico alemán S. G. Hess, quien enunció lo siguiente:

“El calor absorbido o cedido por una reacción química a presión constante es el mismo, independientemente de que ésta ocurra en uno o en varios pasos”.

La demostración es una consecuencia directa de la primera ley. Definamos una nueva función termodinámica llamada la entalpía de un sistema como

$$H = U + pV. \quad (15)$$

Para un proceso infinitesimal y cuasi-estático,

$$\begin{aligned} dH &= dU + pdV + Vdp \\ &= \delta Q - pdV + pdV + Vdp \\ &= \delta Q + Vdp \end{aligned}$$

por la ecuación (12). Si  $p = \text{constante}$ ,

$$dH = (dQ)_p = dQ_p \quad (16)$$

el calor involucrado en el proceso no depende de la trayectoria. Véase también de la ecuación (15) que

$$(\Delta H)_V = (\Delta U)_V + \Delta(pV).$$

Si  $\Delta(pV) \sim 0$ , como en el caso de sólidos y líquidos,  $Q_p \simeq Q_V$ . Si los gases que reaccionan son ideales

$$Q_p = Q_V + (\Delta\nu)RT,$$

donde  $\Delta\nu$  es igual al número de moles de reactivos menos el número de moles de productos.

Para el cálculo de los calores de reacción se toman los estados estándar siguientes:

*Sólido:* forma más estable a 1 atm y  $T$  especificada.

Líquido: forma más estable a 1 atm y  $T$  especificada.

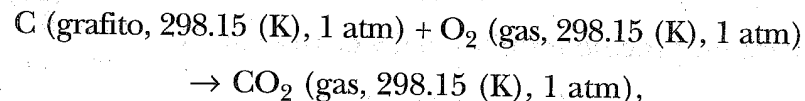
Gas:  $p = 1$  atm y  $T$  especificada.

Carbono: grafito.

Temperatura estándar:  $25^\circ\text{C} = 298^\circ\text{K}$ .

$\Delta H$ :  $> 0$  si la reacción absorbe calor (es endotérmica).

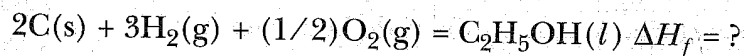
Ejemplo: El calor de formación  $\Delta H_{f0}$  del  $\text{CO}_2$  a  $25^\circ\text{C} = -94.0518$  kcal-mol, implica la siguiente reacción



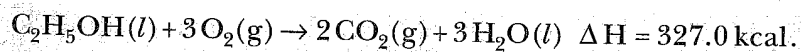
y por convención

$$\Delta H_{f0} \text{ (elemento cualquiera, estado estándar)} = 0.$$

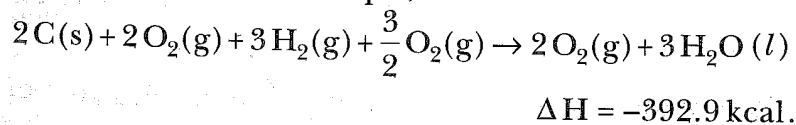
La aplicación de la ley de Hess es muy variada; tanto que sería imposible tratarla aquí con detalle. Sólo como una ilustración, veamos cómo se calcula el calor de formación del alcohol etílico a partir de la reacción de combustión. Esto es



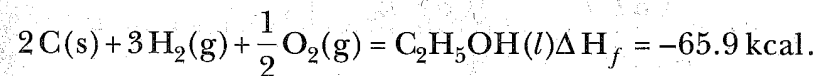
s y g denotan sólido y gas, respectivamente. La reacción de combustión es:



Si sumamos el doble de la segunda reacción con el triple de la tercera obtenemos que,



Si a esta reacción le restamos la primera, obtenemos



Sugerimos al lector que recurra a la literatura amplia y abundante sobre las aplicaciones de esta ley, la cual es muy importante en el estudio de las reacciones químicas. En particular, en bioquímica se hacen análisis muy similares, pero en términos de la energía libre de Gibbs, que veremos más adelante.

Después de esta digresión, larga pero necesaria, regresemos a la *segunda ley de la termodinámica para sistemas cerrados*. Esta ley, la más sutil y delicada de toda esta materia, requeriría de todo un libro para desentrañar su significado. El autor de este capítulo lo ha intentado en varios libros y artículos citados en la bibliografía y escritos desde un nivel elemental, hasta el requerido por los especialistas. Aquí voy a presentar una forma más pragmática de su contenido, dejando que el lector profundice, si así lo desea, consultando otras obras.

Volvamos a la ecuación (13), la forma simplificada de (12) sólo para sistemas fluidos,

$$dU + pdV = \bar{\delta}Q. \quad (13)$$

El miembro izquierdo de la ecuación contiene únicamente variables termodinámicas; esto es, variables que caracterizan los estados de un sistema. El lado derecho es, o mejor dicho, representa energía en tránsito, calor; por lo tanto no es un atributo del sistema. En términos matemáticos, la ecuación (13) no es una diferencial exacta; su evaluación depende de la trayectoria del proceso a lo largo del cual quiera integrarse. Aun tomando, digamos  $U = U(T, V)$  la ecuación se lee como

$$\left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_V dT + \left\{ \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T + p \right\} dV = dQ. \quad (17)$$

¿Es posible expresar  $\delta Q$  de manera que la ecuación (17) sólo contenga variables termodinámicas? En un lenguaje matemático ¿es posible encontrar el factor integrante de  $\delta Q$  para que la diferencial se convierta en exacta? La respuesta es sí y la obtuvo por vez primera en 1876 el gran físico alemán Rudolph Clausius y, casi treinta años después, con todo el rigor matemático deseable, Constantin Carathéodory. No voy a dar las demostraciones aquí, primero, por razones de espacio y, segundo, porque para los propósitos de este trabajo son completamente innecesarias. Baste hacer una analogía con la *primera ley de la termodinámica* utilizando las ideas propuestas desde 1826 por N. L. Sadi Carnot.

Tenemos dos cuerpos: uno caliente a la temperatura  $T_2$  y otro frío a la temperatura  $T_1$ . Carnot pensó en una máquina ideal llamada *de Carnot* o *reversible* tal que, operando en ciclos, extrajera  $Q_2$  unidades de calor, produjera un trabajo  $W$  y cediera  $Q_1$  unidades al cuerpo frío. Al operar en ciclos  $\Delta U = 0$ , esto es, el sistema con el cual opera la máquina, sin importar su naturaleza, siempre regresa a su estado inicial. Entonces, de acuerdo con la primera ley,

$$W = |Q_2| - |Q_1| \quad (18)$$

y la eficiencia  $\eta_c$  de dicha máquina definida como

$$\eta_c \equiv \frac{W}{|Q_2|} = 1 - \frac{|Q_1|}{|Q_2|}. \quad (19)$$

Carnot intuyó que  $\eta_c$  debería depender sólo de la temperatura de las fuentes y fue William Thomson, Lord Kelvin quien, en efecto, mostró que

$$\eta_c = 1 - \frac{T_1}{T_2} \quad (20)$$

y que para cualquiera otra máquina no reversible  $\eta_I < \eta_c$ . De las ecuaciones (17) y (18) se infiere de inmediato que

$$-\frac{|Q_1|}{T_1} + \frac{|Q_2|}{T_2} \leq 0.$$

El gran mérito de Clausius fue darse cuenta que el cociente ( $|Q|/T$ ) no depende ni del proceso, ni de la naturaleza del ciclo, ni de la sustancia operante, esto es, debe ser un atributo del sistema. De aquí propone que todo sistema posee un atributo descrito por una variable termodinámica a la que llamó *entropía*, tal que si el sistema realiza un proceso infinitesimal y cuasiestático, en el cual intercambia calor  $\delta Q$  con un cuerpo a la temperatura  $T$ , entonces,

$$\frac{\delta Q_{\text{rev}}}{T} \equiv dS. \quad (21)$$

Lo que demostró Carathéodory en términos matemáticos es que  $1/T$  es el factor integrante que convierte a  $\delta Q$  en una diferencial exacta. Como  $S$  es una variable termodinámica, podemos suponer que  $S = S(T, V)$  y por lo tanto, usando la ecuación (21), la (17) puede escribirse como

$$\left\{ \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_V - T \left(\frac{\partial S}{\partial T}\right)_V \right\} dT + \left\{ \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T + p - T \left(\frac{\partial S}{\partial V}\right)_T \right\} dV = 0$$

y como  $T$  y  $V$  son variables independientes,

$$C_V = \left( \frac{\partial U}{\partial T} \right)_V = T \left( \frac{\partial S}{\partial T} \right)_V \quad (22)$$

$$p + \left( \frac{\partial U}{\partial V} \right)_T = T \left( \frac{\partial S}{\partial V} \right)_T$$

que proporcionan relaciones entre las variables  $S$  y  $V$ .

La segunda ley de la termodinámica simplemente postula que todo sistema cerrado en equilibrio tiene un atributo caracterizado por la variable  $S$ , tal que

$$\Delta S = S_f - S_i = \int_i^f \frac{dQ_{rev}}{T} \quad (23)$$

para todo procesos reversible entre los estados  $i$  y  $f$ . Si el proceso no es reversible, entonces  $dS > 0$  i.e., para sistemas aislados y cerrados, la entropía nunca puede disminuir si ocurre un proceso entre dos estados de equilibrio  $i$  y  $f$ .

Para un gas ideal ya vimos que  $(\partial U / \partial V)_T = 0$  y por lo tanto, por la ecuación (22),

$$\left( \frac{\partial S}{\partial V} \right)_T = \frac{p}{T} = \frac{R}{V}$$

para una mol de gas. Así,

$$dS = \left( \frac{\partial S}{\partial T} \right)_V dT + \left( \frac{\partial S}{\partial V} \right)_T dV = \frac{C_V}{T} dT + \frac{R}{V} dV$$

y como  $C_V$  es constante, integrando tenemos que

$$S = C_V \ln T + R \ln V + f(N), \quad (24)$$

donde  $f(N)$  es todavía una función desconocida de  $N$ , el

número de moléculas en el gas. Esta función no puede determinarse para un gas encerrado pues  $N = \text{constante}$ . Como experimentalmente se sabe que  $C_V = (3/2)R$ , para los gases monatómicos, la ecuación (24) puede escribirse como

$$S = R \ln V T^{3/2} + f(N). \quad (25)$$

Para terminar con la segunda ley y la definición de la entropía hay que señalar que:

- Las ecuaciones (19) y (21) definen a la función entropía pero, de ninguna manera, aclaran o establecen su significado físico.
- La ecuación fundamental para la segunda ley

$$\Delta S = S_f - S_i \geq 0 \quad (26)$$

es válida sólo para sistemas cerrados y los estados  $i$  y  $f$  deben ser estados de equilibrio, independientemente del proceso que nos lleve de uno o otro. Si éste es reversible, entonces se cumple la igualdad.

- Por ser una función de estados existen  $S = S(T, V)$ ,  $S = S(T, p)$ , etcétera, las llamadas ecuaciones de entropía. La ecuación (22) es un ejemplo de éstas para un gas monatómico ideal. Otros ejemplos importantes pueden ser encontrados por el lector en la literatura.

### 3. SISTEMAS ABIERTOS

Para generalizar las leyes de la termodinámica a sistemas abiertos hay que tener en cuenta ciertos puntos importantes. El primero es que la ley cero no se modifica de manera alguna; el concepto de temperatura no depende de que el sistema sea o no abierto; no así la ecuación de estado.

Sea un sistema de composición variable conteniendo  $n_1$  moles de la componente uno,  $n_2$  de la dos, etcétera hasta digamos,  $r$  componentes. La ecuación (1) toma ahora la forma

$$p = p(V, T, n_1, n_2, \dots, n_r). \quad (27)$$

En el caso de un gas ideal

$$pV = \left( \sum_{i=1}^r n_i \right) RT, \quad (28)$$

que es la famosa ley de Dalton.

Las otras dos leyes sí requieren de mayor cuidado. Inocentemente y aludiendo a las ecuaciones de energía, siguiendo el desarrollo de la ecuación (27) se estaría tentado a escribir que

$$U = U(S, V, n_1, n_2, \dots, n_r)$$

y por lo tanto, para un proceso infinitesimal,

$$dU = \left( \frac{\partial U}{\partial S} \right)_{V, n_j} dS + \left( \frac{\partial U}{\partial V} \right)_{S, n_j} dV + \sum_{i=1}^r \left( \frac{\partial U}{\partial n_i} \right)_{S, V, n_j \neq i} dn_i, \quad (29a)$$

donde en los dos primeros términos el índice  $n_j$  implica  $n_j$  constante para toda  $j$ .

Por otra parte, la ecuación fundamental (12) para fluidos se generaliza haciendo  $\delta Q = TdS$  por ser el proceso reversible y proponiendo que,

$$dU = TdS - pdV + \sum_{j=1}^r \mu_j dn_j. \quad (29b)$$

Comparando las ecuaciones (29a) y (29b), se obtiene que

$$T = \left( \frac{\partial U}{\partial S} \right)_{V, n_j}; \quad p = - \left( \frac{\partial U}{\partial V} \right)_{S, n_j}; \quad \mu_j = \left( \frac{\partial U}{\partial n_j} \right)_{S, V, n_{j \neq i}}. \quad (30)$$

Las dos primeras ecuaciones en (30) son la extensión directa de las correspondientes relaciones para sistemas cerrados; no así la tercera. Las ecuaciones (29a, b) y (30) son muy objetables:

- ¿Cómo podemos medir la energía interna para un sistema abierto? La ecuación (3) ya no es válida; la masa está cambiando.
- ¿Qué significa  $dU$  si  $n_j$  aumenta por  $dn_j$ ?
- ¿Qué significa esta generalización? ¿Qué significado físico tiene  $\mu_j$ ?

Para responder a todas estas interrogantes seguiremos a Josiah Willard Gibbs, el autor de la extensión correcta de las leyes de la termodinámica a sistemas abiertos. Para ello introducimos dos definiciones, a saber:

*Fase.* Es la parte de un sistema físicamente diferente, macroscópicamente homogénea y de composición fija o variable. Puede separarse mecánicamente del resto del sistema y puede fácilmente identificarse por el observador.

*Ejemplo:* una solución saturada de NaCl en presencia de NaCl sólido. Hay dos fases (el agua con sal y la sal sólida) y dos componentes. Puedo separarlas por decantación y luego por evaporación.

*Sistema heterogéneo.* Es aquel formado por dos o más fases. Las variables termodinámicas pueden cambiar discontinuamente en las interfases.

Para intentar justificar las ecuaciones (29a,b) tenemos que definir claramente qué es la energía interna de cada fase de manera independiente, pero ¿y la energía interna total? Para ello usamos la siguiente:



*Hipótesis.* La energía interna total cumple con la propiedad de aditividad; esto es, su valor es la suma de las energías de cada una de las fases.

Que esto se cumpla o no rigurosamente en la práctica sólo podemos evaluarlo *a posteriori*. Ciertamente estamos despreciando la energía de *interacción* o de las interfases, que en el caso de líquidos inmiscibles como el agua y el aceite, podría no ser tan pequeña. Este problema fue resuelto por Gibbs, pero está fuera del alcance de este trabajo (ver referencia [3]).

Ahora hagamos el siguiente "experimento". Supongamos que tenemos un sistema; llamémosle A, aislado descrito por un conjunto de variables  $U, S, V, T, n_1, \dots, n_r$ ; esto es, hay  $r$  componentes. ¿Cómo cambia  $U$  si introducimos cuasi-estáticamente al sistema  $dn_i$  moles de la componente  $i$  si  $V$  y  $n_{j \neq i}$  se mantienen constantes? Para responder procederemos como sigue: conectamos a este sistema  $r$  jeringas pequeñas, cada una conteniendo  $dn_j$  moles de cada componente y cuyas paredes están también aisladas del exterior. Con el émbolo de cada jeringa introducimos  $r$  sustancias y veamos qué pasa al introducir una de ellas. Llamemos a la jeringa correspondiente el sistema B. Ambos sistemas A y B tienen sus propiedades bien definidas y por hipótesis, la energía interna de ambos es

$$U_{A+B} = U_A + dU_B.$$

Llamemos  $u_j, s_j$  y  $v_j$  a las correspondientes propiedades molares  $U_j/n_j$ , etcétera. Al introducir  $dn_j$  moles en A contribuimos a su energía en dos formas: por la modificación intrínseca de su energía  $dU_B$  y por el trabajo necesario para realizar tal proceso *i.e.*, la introducción de esta cantidad de materia, llamémosla  $dU'_B$ . Así,  $dU_B = u_j dn_j$  y claramente

$$dU'_B = dW = p dV = p_j v_j dn_j,$$

y por lo tanto

$$dU = dU_B + dU'_B = (u_j + p_j v_j) dn_j;$$

y para las  $r$  sustancias,

$$dU = \sum_{i=1}^r (\mu_i + p_i v_i) dn_i.$$

Si el proceso lo realizamos permitiendo flujo de calor y trabajo externo de los alrededores, debemos agregar al cambio  $dU$  el cambio externo  $\bar{d}Q + dW$  y por lo tanto,

$$dU = \bar{d}Q + dW + \sum_{i=1}^r (u_i + p_i v_i) dn_i. \quad (31)$$

La ecuación (31) es la expresión matemática de la primera ley de la termodinámica para sistemas abiertos cuando se satisface la hipótesis de aditividad. Utilizando la misma hipótesis para la entropía,  $S = S_A + S_B$  y llamando  $s_j = S_j/n_j$  a la entropía por mol, tenemos que  $dS_B = s_j dn_j$ , en tanto que, por ser el proceso adiabático,  $dS'_B = 0$ ; luego

$$dS_B = \sum_{i=1}^r S_i dn_i.$$

Si quitamos la condición de aislamiento y permitimos que el sistema intercambie calor con sus alrededores, cuya temperatura es  $T$ , tendremos que

$$dS = \frac{\bar{d}Q_{\text{rev}}}{T} + \sum_{i=1}^r s_i dn_i, \quad (32)$$

que es la expresión matemática de la segunda ley para sistemas abiertos. Despejando  $dQ_{\text{rev}}$  de (32) y sustituyendo el resultado en la ecuación (30) obtenemos finalmente que

$$dU = TdS - pdV + \sum_{i=1}^r (u_i + p_i v_i - Ts_i) dn_i, \quad (33)$$

que es la ecuación fundamental de la termodinámica para sistemas abiertos, suponiendo que las propiedades extensivas  $S$  y  $U$  sean aditivas. Si comparamos las ecuaciones (29b) y (33) vemos que podemos definir

$$\mu_i \equiv u_i + p_i v_i - Ts_i \quad (34)$$

el llamado "potencial químico" de la componente  $i$ . Ahora introducimos la bien conocida función de energía libre de Gibbs,

$$G = U + pV - TS = H - TS = F + pV, \quad (35)$$

donde  $F = U - TS$  es la llamada función de Helmholtz. Claramente, el potencial químico  $\mu_i$  no es más que la energía libre de Gibbs por mol

$$\mu_i = \frac{G_i}{n_i}, \quad (36)$$

una definición de mucha utilidad en fisicoquímica. Con los resultados obtenidos podemos encontrar una serie de relaciones entre estas funciones que son de utilidad práctica. Por su naturaleza misma, éstos corresponden a las propiedades de la función  $G$ .

La primera característica es que la función  $G$  contiene toda la información termodinámica de un sistema cuando  $T$  y  $p$ , variables fáciles de medir y de controlar, se toman

como variables independientes. Para mostrarlo reescribimos la ecuación (33) como

$$\begin{aligned} dU &= TdS - pdV + SdT - SdT + Vdp - Vdp \\ &+ \sum_i \mu_i dn_i \\ &= d(TS - pV) - SdT + Vdp + \sum_i \mu_i dn_i. \end{aligned}$$

Si definimos  $G$  como en la ecuación (36), tenemos entonces que

$$dG = -SdT + Vdp + \sum_i \mu_i dn_i. \quad (37)$$

La operación conducente a la ecuación (37) se conoce como una *transformación de Legendre*. Aquí se establece claramente que  $G = G(T, p, n_1, \dots, n_r)$  o bien que

$$dG = \left( \frac{\partial G}{\partial T} \right)_{p, n_i} dT + \left( \frac{\partial G}{\partial p} \right)_{T, n_i} dp + \sum_{i=1}^r \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T, p, n_j \neq i} dn_i.$$

Si comparamos la ecuación anterior con (37), vemos que

$$-S = \left( \frac{\partial G}{\partial T} \right)_{p, n_i}; \quad V = \left( \frac{\partial G}{\partial p} \right)_{T, n_i}; \quad \mu_i = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T, p, n_j \neq i} \quad (38)$$

esto es, del conocimiento de  $dG$ , el primer coeficiente permite calcular las propiedades térmicas del sistema, el segundo las mecánicas, incluyendo la ecuación de estado y el tercero las químicas. Esto último se puede ver como sigue.

Como por (36)

$$G = \sum_{i=1}^r G_i = \sum_i \mu_i n_i$$

$$dG = \sum_i (\mu_i dn_i + n_i d\mu_i). \quad (39)$$

De las ecuaciones (37) y (39)

$$\sum_{i=1}^r n_i d\mu_i = Vdp - SdT, \quad (40)$$

que es la ecuación fundamental de la termodinámica para sistemas abiertos, conocida también como la ecuación de Gibbs-Duhem. Véase además que de las ecuaciones (36) y (38)

$$\mu_i = \frac{G_i}{n_i} = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T, p, n_j \neq i}, \quad (41)$$

que es también consecuencia del *teorema de Euler* para funciones homogéneas.

Tomemos la ecuación (40) para una sola componente,

$$n d\mu = Vdp - SdT.$$

Si definimos  $v^* = V/n$  y  $s^* = S/n$ , el volumen y la entropía molar respectivamente,

$$d\mu = v^* dp - s^* dT.$$

Como ya vimos en páginas anteriores, para un gas ideal

$$pv^* = RT \quad (2)$$

y

$$S^* = C_v^* \ln T - R \ln v^* + S_0^* \quad (24)$$

donde  $S_0^*$  puede todavía ser función de  $n$ . Como

$$\ln v^* = -\ln p + \ln R + \ln T$$

$$S^* = C_p^* \ln T - R \ln p + S_0^{*'} \quad (42)$$

donde  $S_0^{*'} = S_0^* + R \ln R$  y hemos usado la ecuación (14). La ecuación (42) es la ecuación para la entropía molar de un gas ideal cuando  $T$  y  $p$  se toman como variables independientes. Sustituyendo (42) en la ecuación de Gibbs-Duhem y agrupando términos, obtenemos que,

$$d\mu = d \left\{ RT \ln p - C_p^* \int \ln T dT + S_0^{*'} T \right\}$$

que, como el lector puede comprobar es, como debe ser, una diferencial exacta. Usando que,

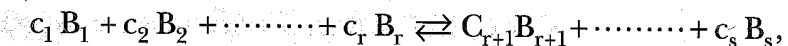
$$\int \ln T dT = + T \ln T - T,$$

si integramos la ecuación de Gibbs-Duhem, obtenemos que,

$$\frac{\mu}{T} = \ln p^R T^{-5/2 R} + \left( \frac{5}{2} R + S_0^{*'} \right) + \frac{\mu_0}{T}, \quad (43)$$

donde hemos usado que  $C_v^* = (3/2) R$ . La ecuación (43) es la expresión matemática del potencial químico para una mol de gas ideal, como función de la presión y la temperatura.

Como una última aplicación, vamos a obtener la llamada *ley de acción de las masas*; esta ley es la versión para el estado de equilibrio de una ley general que gobierna la evolución en el tiempo de las reacciones químicas y es pues fundamental para el estudio de la bioquímica. Simbolicemos a una reacción química como



donde los coeficientes estequiométricos  $c_1, c_2, \dots$ , representan el número de moléculas de cada especie que intervienen en la reacción,  $1 \leq i \leq r$  corresponde a los reactivos  $r+1 \leq i \leq s$  representan los productos. Si tomamos la convención de que dichos coeficientes son positivos para los reactivos y negativos para los productos, la reacción se puede reescribir simplemente como:

$$\sum_{i=1}^s c_i B_i = 0. \quad (44)$$

Si ahora suponemos que la reacción, como suele suceder, ocurre a  $T$  y  $p$  constantes, la condición para que se encuentre en estado de equilibrio es que  $(dG)_{T, p, n_i} = 0$ , esto es, que  $G$  tenga un valor extremal, máximo o mínimo. Como  $T$  y  $p$  son constantes, esta condición, según la ecuación (37) se satisface si

$$\sum_{i=1}^s \mu_i dc_i = 0. \quad (45)$$

Aquí el número de moléculas de cada especie es  $c_i$  y, atención, para cada especie  $c_i$  no es constante, sólo

$$\sum_{i=1}^s c_i = N,$$

el número total de moléculas se conserva.

Vamos ahora a suponer que el cambio en el número de moléculas de cada especie se debe únicamente a la reacción química, esto es,  $dc_i \sim c_i$ , o bien

$$\frac{dc_i}{c_i} = \frac{dc_k}{c_k} = \dots M,$$

donde  $M$  es una constante. La ecuación (44) se transforma en

$$\sum_i \mu_i c_i = 0. \quad (45')$$

Si suponemos ahora que los participantes de la reacción forman una solución ideal,

$$\mu_k = \mu_k^0(T, p) + \ln x_k, \quad (46)$$

donde  $\mu_k^0$  es el potencial químico de la  $k$ -ésima especie referida a un estado estándar y

$$x_k = \frac{c_k}{\sum_k c_k}$$

es la concentración de la especie  $k$ . La ecuación (46) la damos aquí sin demostración, la cual el lector puede encontrar en cualquier libro de termodinámica. Sustituyendo la ecuación (46) en (45'), haciendo uso de propiedades bien conocidas de los logaritmos, se obtiene finalmente que

$$\prod_i x_i^{c_i} = \exp \left\{ - \sum_{i=1}^s c_i \mu_i^{(0)} / RT \right\}. \quad (47)$$

Si ahora definimos

$$\exp \left\{ - \sum_{i=1}^s c_i \mu_i^{(0)} / RT \right\} \equiv K^*(T, p),$$

la ecuación (47), después de utilizar la convención de signos para las  $c$ 's, nos lleva a la expresión

$$\frac{[x_1]^{c_1} [x_2]^{c_2} \dots [x_r]^{c_r}}{[x_{r+1}]^{c_{r+1}} \dots [x_s]^{c_s}} = K^*(T, p). \quad (48)$$

La ecuación (48) es la bien conocida ley de acción de masas (IAM). En soluciones ideales las fracciones molares de las componentes de la reacción son proporcionales a sus concentraciones, esto es

$$[x_i] = \alpha [B_i],$$

donde  $[B_i]$  es la concentración de la especie  $i$ . Por transformaciones muy simples, la ecuación (48) puede reescribirse como

$$\frac{[B_1]^{c_1} \dots [B_r]^{c_r}}{[B_{r+1}]^{c_{r+1}} \dots [N_s]^{c_s}} = K_c^*(T, p) \quad (49a)$$

donde

$$K_c^*(T, p) = \frac{\alpha^{c_1} \dots \alpha^{c_r}}{\alpha^{c_{r+1}} \dots \alpha^{c_s}}. \quad (49b)$$

Con los resultados aquí resumidos, un lector interesado en la biología física contemporánea tiene las bases necesarias

para familiarizarse con los principios de la termodinámica de sistemas abiertos. Regresemos a la ecuación (48) recordando la convención de signos para las  $c$ 's. Entonces,

$$\ln K^*(T, p) = \sum_{i=1}^s c_i \ln x_i$$

y

$$\left( \frac{\partial \ln K^*(T, p)}{\partial T} \right)_p = \sum_{i=1}^s c_i \left( \frac{\partial \ln x_i}{\partial T} \right)_p = \sum_i c_i \frac{\partial}{\partial T} \left\{ \frac{\mu_i^{(eq)} - \mu_i^{(0)}}{RT} \right\}_p - \sum_i \frac{c_i}{RT^2} (\mu_i^{(eq)} - \mu_i^{(0)}).$$

Llamando  $\Delta\mu_i \equiv \mu_i^{eq} - \mu_i^{(0)}$  y recordando la ecuación (45')

$$\left( \frac{\partial \ln K^*(T, p)}{\partial T} \right)_p = \left\{ \Delta G - T \left( \frac{\partial \Delta G}{\partial T} \right)_p \right\} (RT^2)^{-1} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (50)$$

por la bien conocida relación de Gibbs-Helmholtz,  $H = G - T(\partial G/\partial T)_p$ . La ecuación (50) es la llamada ecuación de Van't Hoff, relacionando la diferencia de entalpías de una reacción química con el logaritmo de la constante de equilibrio  $K^*(T, p)$ . Un buen ejemplo de aplicaciones de estos resultados al caso de la glicólisis en bioquímica, los encuentra el lector en el capítulo 16 del libro sobre *Bioquímica* de Lehninger, citado en la bibliografía de este capítulo.

#### 4. ORDEN, DESORDEN Y ENTROPÍA

En las discusiones que hicimos en las secciones anteriores sobre las dos leyes fundamentales de la termodinámica en sistemas cerrados y abiertos, hemos empleado todo un conjunto de variables termodinámicas que tienen un significado físico claro y son fácilmente medibles experimentalmente,  $p$ ,  $V$ ,  $T$ ,  $H$ , etcétera. No es así en el caso de la entropía, uno de los conceptos más escurridizos, más controvertidos y más prostituidos de la fisicoquímica teórica: ¿Qué es la entropía? ¿Qué tiene que ver esta variable con el concepto de orden (o desorden) e, inclusive, con la direccionalidad de los procesos naturales? Vamos aquí a dar una explicación y una respuesta un tanto simple, pero profunda. Para ello seguiremos los razonamientos de uno de los más grandes pensadores de la física, Max Planck.

A manera de un breve paréntesis histórico, vale la pena señalar que Planck, al iniciar su obra cumbre sobre la naturaleza de la radiación de un cuerpo negro tenía, necesariamente, que recurrir a las propiedades de las soluciones de las ecuaciones de Maxwell para describir dicha radiación. En esa época, la última década del siglo XIX, era un fiel creyente en la física clásica y no aceptaba la naturaleza discreta de la materia, ya bien arraigada en la teoría cinética de los gases, a través de los trabajos de Krönig, Clausius, Maxwell y Boltzmann, quien finalmente debe ser considerado el verdadero creador de la física estadística.

Planck no sólo no aceptaba la existencia de átomos o moléculas, mucho menos que las leyes de la física tuvieran matices estadísticos; esto es, que estuvieran invadidas por conceptos probabilísticos. Su actitud hacia estos dos aspectos cambió radicalmente después de elaborar la teoría de la radiación del cuerpo negro ya que, para explicar su naturaleza intrínseca, se vio obligado a introducir conceptos

totalmente arraigados a la teoría de las probabilidades. Y para la segunda década del siglo XX, cuando escribe su magnífica obra sobre la teoría del calor, acepta totalmente la naturaleza estadística de las leyes de la física y las usa de manera abierta al discutir, sobre todo, el concepto de entropía. Su razonamiento, que usaremos aquí para un fluido en lugar de la radiación electromagnética, lo atribuye a la enorme influencia que finalmente ejerció sobre él el trabajo de Boltzmann.

Al reescribir su famoso *Tratado de Termodinámica Clásica* en 1932, parte de un hecho inaudito, a saber, afirma que:

Todo proceso físico o químico que ocurre en la naturaleza tiene lugar de manera que la suma de las entropías de todos los cuerpos que sufren un cambio en dicho proceso, o bien permanecen constantes, o sufren un aumento.

En breve, esto significa que la entropía es una medida de la probabilidad termodinámica. Esta afirmación proviene de su argumentación sobre la segunda ley de la termodinámica, a saber, cuando un proceso entre dos estados de equilibrio tiene lugar en un sistema dado, el estado final tiene una *probabilidad termodinámica* o un *peso termodinámico* mayor que el estado inicial. Esto es, el contenido de la segunda ley nos da una medida de la magnitud de la probabilidad termodinámica de la configuración física de un sistema en un estado dado. Nuestra tarea, dice Planck, es cómo encontrar esta medida. Si bien es cierto que macroscópicamente la respuesta a esta pregunta no altera los razonamientos tradicionales que siguen a la ecuación (26), que constituyen la base de la termodinámica clásica, la cual someramente hemos desarrollado en la sección anterior, desde un punto de vista microscópico exhibe rasgos muy diferentes.

Para responder la respuesta a la pregunta planteada en el párrafo anterior, es necesario tener una intuición más profunda acerca de la naturaleza de un sistema físico. En efecto, la descripción microscópica de un sistema se determina, como ya dijimos, a través de sus atributos: su temperatura, presión, densidad, composición, etcétera. Sin embargo, desde el punto de vista microscópico estas cantidades se desvanecen como conceptos autodependientes; únicamente se pueden interpretar a través de cantidades que exhiben valores promedio.

Así por ejemplo, si tomamos un fluido, por simplicidad monatómico, fluyendo por un ducto y especificamos su estado mediante las variables densidad, velocidad, hidrodinámica y energía interna (o temperatura), su descripción microscópica requeriría conocer las posiciones y velocidades de los trillones y trillones de moléculas que forman el gas ( $N \sim 10^{23}$  para una mol) a un tiempo dado. Aunque desde el punto de vista mecanicista esta descripción dinámica sería la ideal, en la termodinámica no tendría ningún sentido, pues la información experimental deseada es completamente ajena a una descripción tan detallada. Todo lo que un observador puede controlar en el laboratorio son cantidades macroscópicas, atributos medibles de un sistema, no sus cantidades microscópicas.

En general, podemos pensar que a una descripción macroscópica dada le corresponde un número enorme de *configuraciones microscópicas* y que la primera sólo refleja un comportamiento *promedio* de la dinámica microscópica del sistema. La pregunta entonces se reduce a ¿cómo podemos establecer una relación entre ambas? y, claramente, la respuesta depende de un "factor" adicional que es independiente de la dinámica misma del sistema en cuestión. Este factor no es otra cosa que lo que hoy en día se toma como el postulado fundamental de la física estadística y que consiste en lo siguiente:

Todo estado macroscópico de un sistema dado está conformado por un número enorme de estados microscópicos del mismo, que son compatibles con él. Estos estados microscópicos o *microestados* son imposibles de medir, por lo que **suponemos** que son igualmente probables. Así, la probabilidad termodinámica del macroestado de un sistema dado queda determinada por el número de microestados que lo configuran. Este razonamiento conduce de manera automática al establecimiento de una hipótesis de enorme importancia en la física y que constituye toda la base de la termodinámica:

"Todo estado macroscópico de un sistema físico está constituido por un conjunto discreto, pero enorme, de microestados bien definido y este conjunto representa la probabilidad termodinámica (o el peso estadístico)  $W$  de dicho estado macroscópico."

La probabilidad termodinámica del estado macroscópico de un sistema dado es una medida de la entropía del sistema en cuestión para dicho macroestado y, por lo tanto,

$$S = f(W), \quad (51)$$

donde  $f$  es una función universal del argumento  $W$ . La ecuación (51) es la base de todo el razonamiento de Planck y constituye la piedra fundamental sobre la cual está constituida toda la física estadística contemporánea. Las consecuencias de la ecuación (51) están contenidas en todos los tratados en la materia. Aquí nos restringiremos a utilizarla para poder discutir y entender los conceptos "orden" y "desorden", tan frecuentemente utilizados, no sólo en biología, sino en otras tantas disciplinas relacionadas con conceptos nacidos de la física teórica.

Veamos primero la función  $f$ . Si tomamos dos sistemas independientes con entropías  $S_1$  y  $S_2$  la entropía total  $S_{12} = S_1 + S_2$ . Por otra parte, como cada microestado de un sistema se puede combinar con cada estado del otro sistema,  $W_{12} = W_1 W_2$ , luego

$$f(W_1 W_2) = f(W_1) + f(W_2)$$

cuya solución, como demostraremos en un apéndice, es

$$f(W) = k \ln W, \quad (52)$$

donde eventualmente se muestra que  $k$  es la constante de Boltzmann ( $k = 3.2983 \times 10^{-24}$  cal/(C)).

La ecuación (52) es la más importante de toda la física estadística. Escrita así, fue obtenida por Planck y no por Boltzmann, como la gente suele pensar.  $W$  puede interpretarse como una medida del desorden atómico del sistema en cuestión. No es el propósito de este artículo discutir los alcances y limitaciones de esta ecuación, pero bastaría un ejemplo para ilustrar lo que representa.

Supongamos que tenemos una caja con cien bolas idénticas, unas negras y otras blancas. Estas bolas constituyen los microestados y la probabilidad de sacar una blanca o negra de la caja es la misma. Ahora formemos los macroestados, cada uno constituido por cincuenta bolas, esto es, tenemos un número igual de maneras de extrar bolas de las cajas. Claramente, en cincuenta intentos, sacar cincuenta bolas blancas (o negras) o sacar  $n$  bolas blancas y  $50 - n$  bolas negras, los dos eventos son igualmente probables. El macroestado con cincuenta bolas de un solo color sería, sin embargo, el más ordenado para ese color y sólo hay uno. Si por el contrario, sacáramos veinticinco bolas negras y otras tantas blancas, el número del macroestado sería de

$$W = \frac{50!}{25!25!} \sim 10^{10};$$

esto es, la probabilidad de sacar veinticinco bolas negras y el mismo número de blancas es diez mil millones de veces mayor a sacar el estado ordenado. Esto es, prácticamente, cualquier macroestado desordenado tiene una probabilidad mucho mayor de ocurrir que el ordenado. En otras palabras, cuando ocurre un proceso (extraer bolas) es infinitamente más fácil caer en un estado desordenado, consecuentemente  $\ln W$  aumenta y, por lo tanto,  $S$  aumenta. La evolución hacia el desorden está dictada por la estadística, **no** por el tiempo. Esta ley fundamental de la física representa la tendencia natural de los estados macroscópicos de sistemas a tender a un estado desordenado (caótico).

Parafraseando a Schrödinger, ¿cómo podríamos expresar en términos de una teoría estadística la maravillosa facultad de un ser vivo de retrasar un decaimiento al estado de equilibrio (la muerte)? La respuesta de acuerdo con este autor es que se alimenta de entropía negativa atrayendo un "flujo de entropía" negativo hacia sí mismo para compensar el incremento de entropía que produce la vida y mantenerse así en un estado de entropía relativamente bajo. La ecuación  $S = k \ln W$ , la podemos escribir como,

$$-S = k \ln \frac{1}{W}$$

la entropía con signo negativo es una medida del orden  $1/W$ . Su relación con la interpretación de esta ecuación para muchos procesos y estados biológicos es hoy en día un tema fascinante. Sirva esta modesta introducción para provocar la inquietud y curiosidad del lector intresado en estos aspectos de la física biológica.



Para terminar con esta sección es importante hacer un comentario con respecto a la ecuación (53). Para describir un sistema termodinámico no basta con plantearla; el reto y principal obstáculo en el camino es el cálculo de  $W$ . Para sistemas formados por partículas independientes no hay problema, pero si tomamos en cuenta las interacciones entre ellas, la tarea se convierte en un esfuerzo gigantesco. En biología, salvo por algunos casos muy particulares, esta tarea es todavía más compleja y a menudo requiere de gran capacidad de cómputo electrónico, así como de intentar entender las interacciones elementales entre las diferentes componentes de las moléculas biológicas. Éste, *per se*, es otro tema de enorme interés actual.

## 5. TERMODINÁMICA DE PROCESOS IRREVERSIBLES

Todo lo que hemos dicho hasta ahora se aplica para sistemas que se encuentran con su estado de equilibrio y los que son de nuestro interés, en especial los sistemas biológicos, distan mucho de estarlo. Los procesos que ocurren en los seres vivos, por simples que éstos sean, son fuertemente dependientes del tiempo y su estudio está en manos de la hoy conocida como *teoría de los procesos irreversibles*. Esta parte de la fisicoquímica está muy lejos de ser un hecho consumado y, en efecto, es un tema que todavía está en proceso de desarrollo. Por lo tanto, más que intentar aquí una presentación muy formal y general de la materia, me limitaré a discutir cuáles son sus rasgos más importantes, tomando como ejemplo procesos que ocurren con mucha frecuencia en sistemas biológicos. Sólo voy a insistir en una hipótesis que es imprescindible para la comprensión de hasta dónde hoy se ha desarrollado la termodinámica irreversible y que es la poco comprendida y muy debatida *hipótesis del equilibrio local* (HEL).

Supongamos que se ha elegido para su estudio un sistema arbitrario que está encerrado en una región finita del espacio. El sistema puede consistir de varias fases, cada una con una o más especies  $y$ , por lo tanto, puede haber intercambio de masa entre las diversas fases del sistema. Lo único que requerimos es que la masa total o el número total de las partículas en el sistema se conserve. Ahora, dividimos el sistema en pequeñas celdas cuya longitud característica  $\ell$  es mucho mayor que las dimensiones atómicas  $\lambda$  y mucho menor que  $L$ , la longitud característica del sistema,  $\lambda \ll \ell \ll L$ . Así, en un volumen  $\ell^3$  puede haber suficientes partículas para considerarlo un continuo, pero dicho número es mucho menor al número total de partículas en el sistema. Cada elemento de volumen está especificado por un vector de posición  $\vec{r}$ , respecto a un sistema de coordenadas fijo en el laboratorio a un tiempo  $t$ . Supongamos que las variables que caracterizan a dicho sistema (volumen) son su energía interna  $e(\vec{r}, t)$ , su densidad  $\rho(\vec{r}, t)$ , su composición  $n_i(\vec{r}, t)$ ,  $i = 1, \dots, n$  el número de especies. La hipótesis de equilibrio local establece que en cada volumen  $\ell^3$  prevalece el estado de equilibrio termodinámico; esto es, cualquier otra variable del sistema  $x(\vec{r}, t)$  será la misma función de  $e$ ,  $\rho$ ,  $n_i$ , etcétera, que en equilibrio termodinámico

$$x(\vec{r}, t) = [e(\vec{r}, t), \rho(\vec{r}, t), n_i(\vec{r}, t)]. \quad (53)$$

Por ejemplo, para una mezcla de  $n$  gases ideales,

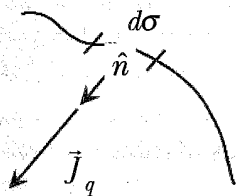
$$p(\vec{r}, t) = \{n_1(\vec{r}, t) + n_2(\vec{r}, t) + \dots\} RT(\vec{r}, t) \quad (54)$$

la ley de Dalton es válida "localmente"; y así sucesivamente. Claramente si la ecuación (53) es idéntica para todo punto

$\vec{r}$  y a todo tiempo  $t$ , entonces llegamos al ya conocido caso del equilibrio termodinámico.

Es necesario hacer notar que la ecuación (53) **no** tiene validez universal. Hay sistemas como los polímeros, los vidrios, medios elásticos y otros, donde el estado del sistema requiere de un mayor número de variables usualmente no convencionales, para especificar sus estados. Esto dio lugar a muchos intentos, siete por lo menos, de extender dicha ecuación. Estos intentos, todos incluidos en lo que se llama la *termodinámica irreversible extendida* no han sido convincentes, esto es, no han resuelto el problema de una manera completamente satisfactoria. Si el lector se tropieza con alguno de ellos debe utilizarlo con mucha cautela pues conceptos, sobre todo el de entropía, tienen interpretaciones vagas o erróneas.

Vamos ahora a estudiar algunos procesos de transporte que son importantes. Empecemos por el flujo de calor. Tomamos un cuerpo arbitrario rodeado por una superficie  $\sigma$  y llamamos  $\vec{J}_q \cdot \hat{n}$  al flujo de calor que penetra a la superficie por unidad de área y unidad de tiempo y  $\hat{n}$  es un vector unitario hacia el interior de  $\sigma$ . Por el principio de conservación de la energía (no hay trabajo externo  $\bar{d}W=0$ ), la tasa de cambio de la energía interna  $U$  está dada por,



$$dt \frac{\partial U}{\partial t} = dt \int \vec{J}_q \cdot \hat{n} d\sigma.$$

En general  $U=U(T, \rho)$  pero si  $\rho=$  constante, tenemos que

$$\frac{\partial U}{\partial t} = \left( \frac{\partial U}{\partial T} \right)_v \frac{\partial T}{\partial t} = \rho c_v \left( \frac{\partial T}{\partial t} \right) dt$$

pues  $\rho d\tau$  es un elemento de masa si  $\rho$  es la densidad y, por lo tanto,

$$dt \int \rho c_v \frac{\partial T}{\partial t} d\tau = dt \int \vec{J}_q \cdot \hat{n} d\sigma;$$

y por el teorema de Gauss, recordando que  $\vec{J}_q$  fluye hacia el interior

$$\int_V \left( \rho c_v \frac{\partial T}{\partial t} + \text{div} \vec{J}_q \right) d\tau = 0$$

para todo volumen  $V$ . Entonces,

$$\rho c_v \frac{\partial T}{\partial t} + \text{div} \vec{J}_q = 0. \quad (55)$$

(55) es la ecuación de conservación de la energía si  $\rho=$  constante. Véase que un resultado análogo se puede obtener si en lugar de  $\vec{J}_q$  tomamos  $\vec{J}_n$ , el flujo de materia hacia el interior de  $V$ , y  $n(\vec{r}, t)$  es la densidad numérica de partículas en el punto  $\vec{r}$  al tiempo  $t$ . En este caso,

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \text{div} \vec{J}_n = 0. \quad (56)$$

es la ecuación de conservación del número de partículas que entra al volumen  $V$ . A la ecuación (56) se le conoce como la ecuación de difusión. Ahora veamos qué nos dice la hipótesis del equilibrio local. Como  $V =$  constante,  $S = S(U)$  y

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \left( \frac{\partial S}{\partial U} \right)_v \frac{\partial U}{\partial t} = \frac{1}{T} \rho c_v \left( \frac{\partial T}{\partial t} \right),$$

donde hemos usado la ecuación (12) con  $\bar{d}Q = TdS$ . De la ecuación (55)

$$\frac{\partial S}{\partial t} = -\frac{1}{T} \operatorname{div} \bar{J}_q = -\operatorname{div} \left( \frac{\bar{J}_q}{T} \right) + \bar{J}_q \cdot \operatorname{grad} \frac{1}{T}$$

y por lo tanto,

$$\frac{\partial S}{\partial t} + \operatorname{div} \bar{J}_s = \sigma, \quad (57)$$

es la ecuación de balance para la entropía donde

$$\bar{J}_s = \bar{J}_q / T$$

es el flujo de entropía a través de la superficie del sistema y  $\sigma$ , siguiendo a Clausius, se conoce como la producción de entropía y está dada por

$$\sigma \equiv \bar{J}_q \cdot \operatorname{grad} \frac{1}{T} = -\frac{1}{T^2} \bar{J}_q \cdot \operatorname{grad} T \quad (58)$$

donde  $T^2 > 0$ ,  $\operatorname{grad} T$  es la "fuerza termodinámica" que produce el flujo de calor  $\bar{J}_q$ . Si ahora recurrimos al experimento y suponemos que entre  $\bar{J}_q$  y  $\operatorname{grad} T$  existe una relación lineal, a saber,

$$\bar{J}_q = -\kappa \operatorname{grad} T \quad (59)$$

donde  $\kappa$  es la llamada conductividad térmica,

$$\sigma = \frac{\kappa}{T^2} \operatorname{grad} T \cdot \operatorname{grad} T.$$

Como  $\kappa > 0$ , de acuerdo con el experimento,

$$\sigma > 0 \quad (60)$$

la producción de entropía  $\sigma$  es positiva definida. Como  $\sigma = \sigma(\vec{r}, t)$ , a la ecuación (60) se le conoce como la forma local de la segunda ley de la termodinámica. Pero además, cuando (59) se sustituye en (60),

$$\rho c_v \frac{\partial T}{\partial t} = \operatorname{div}(\kappa \operatorname{grad} T)$$

y si  $\kappa$  no depende de la posición,

$$\rho \frac{\partial T}{\partial t} = D_T \nabla^2 T \quad (61)$$

es la bien conocida ecuación de Fourier que permite calcular el perfil de temperaturas en un medio por donde fluye un flujo de calor  $\bar{J}_q$ . A la cantidad

$$D_T = \frac{\kappa}{\rho c_v} \quad (62)$$

se le conoce como la difusividad térmica del material.

Por otra parte, la ecuación (55) tiene cuatro incógnitas  $T$  y  $\bar{J}_q$ , luego no es posible resolverla. La ecuación (59) que relaciona  $\bar{J}_q$  con la variable de estado  $T$  es conocida como una *ecuación constitutiva* y conduce a la ecuación (61) que es, en principio, soluble dadas las condiciones iniciales y de frontera del problema y  $D_T$ .

El análisis de la difusión es idéntico y no lo repetiremos aquí. La ecuación constitutiva es la llamada ecuación de Fick,

$$\bar{J}_n = -D \operatorname{grad} n, \quad (63)$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión. Si  $D = \text{constante}$  y (63) se sustituye en (56), obtenemos que

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D \nabla^2 T, \quad (64)$$

que es la llamada ecuación de difusión.

Puesto que la difusión es un fenómeno que tiene una analogía con el movimiento browniano y éste es ahora la base de los llamadas *motores moleculares*, los cuales están jugando un enorme papel en la biología moderna, haremos una descripción de esta relación, la cual es relativamente simple.

A pesar de que Einstein y Smoluchowski habían explicado ya el movimiento browniano en 1905-1906, el método canónico que se ha seguido para tratar este problema fue desarrollado por Paul Langevin en 1908 y aquí lo presentaremos en su forma original. Langevin comienza por agradecer a M. de Gouy el haber formulado claramente la hipótesis que visualiza el movimiento continuo y desordenado de partículas de masa  $M$ , suspendidas en un líquido en equilibrio térmico a la temperatura  $T$  y constituido por moléculas de masa  $m \ll M$ , como el *eco* de la agitación térmica molecular. Además, Gouy había encontrado esto experimentalmente, al menos de manera cualitativa, mostrando la permanencia perfecta del movimiento browniano y su indiferencia hacia fuerzas externas, siempre y cuando éstas no modifiquen la temperatura del medio en que se encuentren.

La ecuación que Einstein había obtenido para verificar la teoría establece que al final de un lapso de tiempo  $\tau$ , el desplazamiento medio cuadrado  $\overline{\Delta_x^2}$  del desplazamiento  $\Delta_x$  de una partícula esférica en una dirección  $x$ , como resultado del movimiento browniano en un líquido y como

función del radio " $a$ " de la partícula, la viscosidad del líquido  $\eta$  y de la temperatura  $T$ , es:

$$\overline{\Delta_x^2} = \frac{RT}{N} \frac{1}{3\pi\eta a} \tau \quad (65)$$

donde  $R$  es la constante del gas perfecto por gramo-mol,  $N$  el número de Avogadro y por lo tanto,  $R/N = k_B$ , la constante de Boltzmann.

Langevin afirma que la aplicación correcta del método de Smoluchowski permite recuperar exactamente la fórmula de Einstein y, más aún, que es fácil dar una demostración por un método enteramente diferente. El punto de partida es el mismo. El teorema de equipartición de la energía cinética entre los varios grados de libertad de un sistema en equilibrio térmico requiere que una partícula, suspendida en cualquier líquido, posea una energía cinética promedio en la dirección  $x$

$$\frac{1}{2} M \overline{\dot{x}^2} = \frac{k_B T}{2}, \quad (66)$$

donde  $\dot{x} \equiv dx/dt$  es la velocidad de la partícula. Pero esta energía promedio es igual a la de una molécula de un gas cualquiera, en una dirección dada, a la misma temperatura. Ahora bien, una partícula como la que estamos considerando, grande relativa a la distancia entre las moléculas del líquido, experimenta una fuerza viscosa igual a  $-6\pi\eta a \dot{x}$ , de acuerdo con la fórmula de Stokes. De hecho, éste es sólo un valor promedio y, debido a la irregularidad de los choques con las moléculas vecinas, la acción del fluido sobre la partícula oscila alrededor de este valor. Esto implica que la ecuación de movimiento en la dirección  $x$  sea

$$M \frac{d^2 x}{dt^2} = -6\pi\eta a \frac{dx}{dt} + X(t). \quad (67)$$

Respecto a la fuerza complementaria  $X(t)$ , sabemos que es indiferentemente positiva o negativa y de magnitud tal que mantiene la agitación de la partícula que la fuerza viscosa detendría si no estuviera presente. Si ahora multiplicamos (67) por  $x$  y hacemos uso de la identidad

$$x\ddot{x} = \frac{d}{dt}(x\dot{x}) - \dot{x}^2$$

obtenemos que

$$M \frac{d}{dt}(x\dot{x}) - M\dot{x}^2 = \alpha x\dot{x} + xX(t), \quad (68)$$

donde  $\alpha = 6\pi\eta a$ .

Si ahora consideramos un número grande de partículas idénticas y tomamos el promedio de las ecuaciones (68), escritas para cada una de ellas, el promedio  $\overline{xX(t)} = \bar{x} \overline{X(t)} = 0$ , debido a la irregularidad de la fuerza  $X$ . Entonces, usando la ecuación (66)

$$M \frac{d}{dt} \overline{(x\dot{x})} - k_B T = \alpha \overline{x\dot{x}}. \quad (69)$$

Suponiendo que

$$\frac{d}{dt} \overline{x\dot{x}} = \frac{d}{dt} \overline{x\dot{x}}$$

(¡que no es trivial!), la solución de la ecuación (69) es

$$\overline{x\dot{x}} = C e^{-\gamma t} + \frac{k_B T}{\alpha}, \quad (70)$$

donde  $\alpha = M\gamma$ . Si suponemos que a  $t = 0$ ,  $\bar{x} = 0$ ,  $C = -k_B T/\alpha$  y, por lo tanto,

$$\langle x\dot{x} \rangle = \frac{1}{2} \frac{d}{dt} \overline{(x^2)} = \frac{k_B T}{\alpha} (1 - e^{-\gamma t}).$$

Como  $\gamma = \alpha/M = 6\pi\eta a/M$ , su inverso es el tiempo característico,  $\sim 10^{-8}$  seg, para que tengamos un régimen constante. Así que en un régimen de agitación constante

$$\frac{d}{dt} \overline{(x^2)} = \frac{k_B T}{3\pi\eta a}$$

y para un intervalo  $\tau (> 10^{-8}$  seg)

$$\overline{\Delta_x^2} = \overline{(x^2)} - (x_0^2) = \frac{k_B T}{3\pi\eta a} \tau, \quad (71)$$

que es precisamente la ecuación (65), deducida por Einstein. Como veremos en seguida, este resultado corresponde al de una partícula que se difunde en un líquido, siguiendo un camino aleatorio con una constante de difusión  $D = k_B T/\alpha$ .

Para ello volvamos a la ecuación (64) que, escrita en una dimensión ( $\nabla^2 \equiv \partial^2 / \partial x^2$ ) se lee

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D \frac{\partial^2 n}{\partial x^2}$$

cuya solución, como puede verificarse por sustitución directa, es

$$n(x, t) = \frac{N}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-x^2/4Dt}, \quad (72)$$

donde

$$\int_{-\infty}^{+\infty} n(x,t) dx = N \quad (73)$$

es el número total de partículas.

Entonces, por definición de promedio

$$\overline{x^2(t)} \equiv \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} x^2 n(x,t) dx}{\int_{-\infty}^{+\infty} n(x,t) dt} = 2Dt,$$

que es precisamente la ecuación (62) ( $t = \tau$ ). El movimiento difusivo es la contrapartida macroscópica del movimiento browniano. Ambos constituyen las bases físicas de lo que hoy se conoce como procesos aleatorios (estocásticos), en particular los procesos markoffianos. El lector interesado puede consultar la literatura si desea profundizar más en este tema.

Después de la digresión anterior, surge en forma natural una pregunta: ¿Pueden coexistir la difusión y el flujo de calor en un sistema dado? La respuesta es afirmativa y está respaldada por el principio de Curie que establece que en un sistema isotrópico sólo pueden acoplarse flujos y fuerzas del mismo orden tensorial; esto es, escalares con escalares, vectores con vectores, etcétera. Así, para este tipo de sistemas si hay  $r$  flujos, llamémosles  $\vec{J}_q$  ( $i = 1, \dots, r$ ) que son vectores y sus correspondientes fuerzas  $\vec{X}_i$ , la termodinámica irreversible establece que

$$\vec{J}_i = \sum_{k=1}^s L_{ik} \vec{X}_k \quad i = 1, \dots, s. \quad (74)$$

A la matriz formada por los elementos  $L_{ik}$  se le conoce como la *matriz de los coeficientes de transporte*. Su característica más relevante es que, a partir de los principios de la mecánica estadística, Lars Onsager demostró que debe ser una matriz simétrica, esto es,

$$L_{ik} = L_{ki} \quad (75)$$

para toda  $i$  y  $k$ . A la ecuación (75) se le conoce como el *principio de reciprocidad de Onsager* y es la piedra fundamental de la termodinámica irreversible clásica (TIC).

Así pues, si hay gradientes térmicos y de concentración en un sistema, los flujo de calor y de masa están dados por

$$\vec{J}_q = L_{qq} \text{grad } T + L_{qm} \text{grad } n \quad (76)$$

$$\vec{J}_m = L_{mq} \text{grad } T + L_{mm} \text{grad } n.$$

El coeficiente  $L_{qm}$  se conoce como el *coeficiente de Dufour* y describe el fenómeno llamado termodifusión, en tanto que a  $L_{mq}$  se le conoce como el *coeficiente de Soret* y describe la difusión térmica. Con excepción de mezclas gaseosas para las cuales la teoría cinética de los gases permite obtener sus expresiones analíticas, todos los coeficientes involucrados en las ecuaciones (76) se obtienen del experimento. Es también así como se puede comprobar la ecuación (75), en este caso que  $L_{mq} = L_{qm}$ .

En algunos sistemas biológicos estos flujos están modulados por la presencia de un campo eléctrico  $\vec{E}$  que, por ser conservativo, puede escribirse como  $\vec{E} = \text{grad } \phi$ , donde  $\phi$  es el potencial electrostático. En este caso, las ecuaciones (76) se extienden para incluir dicho efecto y se leen como

$$\bar{J}_q = L_{qq} \text{grad } T + L_{qm} \text{grad } n + L_{qe} \text{grad } \phi \quad (77)$$

$$\bar{J}_m = L_{mq} \text{grad } T + L_{mm} \text{grad } n + L_{me} \text{grad } \phi$$

y una ecuación para el flujo de carga (flujo iónico en muchos casos)

$$\bar{J}_e = L_{eq} \text{grad } T + L_{em} \text{grad } n + L_{ee} \text{grad } \phi.$$

$L_{qe}$  describe el *efecto Benedicks* o de electropirosis,  $L_{me}$  el *efecto Reuss* o electroforesis,  $L_{mq}$  describe el *efecto Thomson* o termoeléctrico,  $L_{em}$  el *efecto Dorn* y  $L_{ee}$  es simplemente la conductividad eléctrica. De nuevo, a la igualdad entre los coeficientes de Soret y Dufour debe agregarse que  $L_{me} = L_{em}$  y que  $L_{eq} = L_{qe}$ .

Por ser los procesos biológicos necesariamente irreversibles, la utilización de estas relaciones entre flujos y fuerzas, así como las relaciones de reciprocidad de Onsager (ecuación (75)) son, obviamente, de gran importancia. No es este el texto para una exposición más exhaustiva de dichas aplicaciones, pero, con el material aquí vertido, al lector interesado se le facilitará profundizar más en la vasta literatura disponible sobre este tema de gran actualidad.

## BIBLIOGRAFÍA

### I. OBRAS DE CARÁCTER GENERAL

1. E. Schrödinger, *What is life?*, Cambridge University Press, Cambridge (2004) (reimpresión).
2. A. V. Finkelstein y O. B. Ptitsyn, *Protein physics*, Academic Press, Nueva York (2002).
3. A. L. Lehninger, *Biochemistry*, Worth Publications Inc., Nueva York, segunda edición (1979).

4. A. L. Lehninger, *Bioenergética*, Fondo Educativo S. A., México (1975).
5. E. R. M. Kay, *Biochemistry: an introduction to dynamic biology*, The Macmillan Co., Nueva York (1966).

### II. TERMODINÁMICA CLÁSICA

1. L. García-Colín, *De la máquina de vapor al cero absoluto (calor y entropía)*, Colección *Ciencia Para Todos*, núm. 5, Fondo de Cultura Económica, México, D. F., cuarta reimpresión (2008).
2. L. García-Colín, *Introducción a la termodinámica clásica*, Editorial Trillas, México, D. F., cuarta edición (2008).
3. L. García-Colín, *Introducción a la termodinámica de sistemas abiertos*, El Colegio Nacional, México, D. F., segunda edición (2002).
4. M. Criado-Sancho y J. Casas-Vázquez, *Termodinámica química y de procesos irreversibles*, Addison-Wesley Iberoamericana, México (1988).
5. J. M. Klotz y R. M. Rosenberg, *Chemical thermodynamics: basic theory and methods*, Benjamin Inc., Menlo Park, Cal. (1972).
6. P. A. Rock, *Chemical thermodynamics, principles and applications*, The Macmillan Co., Nueva York (1989).

### III. ORDEN, DESORDEN Y ENTROPÍA

1. D. Ruelle, *Casualidad y caos*, Dirección de Divulgación de la Ciencia, UNAM, México, D. F. (2003).
2. M. Born, *The natural philosophy of cause and chance*, Oxford University Press, Oxford (1949).
3. L. García-Colín, *Las ideas de Boltzmann*, Memoria de El Colegio Nacional 2006, p. 129 (2007).
4. H. Morowitz, *Entropy for biologists*, Academic Press, Nueva York (1970).

### IV. PROCESOS IRREVERSIBLES

1. L. García-Colín y P. Goldstein, *La física de los procesos irreversibles*, vol. 1, El Colegio Nacional, México, D. F. (2003).

2. Y. Demirel, *Non-equilibrium thermodynamics*, Elsevier, Amsterdam (2007).
3. D. S. Lemans y A. Gythiel, *Paul Langevin's 1908 paper "On the theory of brownian motion"*, *Am. J. Phys.* **65**, 1079 (1997).
4. A. Einstein, *Investigations of the theory of brownian motion*, Dover Publications Inc., Nueva York (1956).
5. L. García-Colín, *Termodinámica de procesos irreversibles*, Colección CBI, UAM-Iztapalapa, México, D. F. (1990).
6. J. M. Rubí, *The long arm of the second law*, *Scientific American*, vol. 229, p. 40 (Nov. 2008).

## APÉNDICE

Demostración de la afirmación que, si se establece la relación

$$S = f(W),$$

entonces

$$f(W) = k \ln W.$$

En efecto, como se requiere de la extensividad de  $S$  y la propiedad multiplicativa de la probabilidad  $W$ , para dos sistemas cualesquiera

$$f(W_1 W_2) = f(W_1) + f(W_2). \quad (\text{A.1})$$

Diferenciando, digamos respecto a  $W_1$ ,

$$\frac{df(W)}{dW_1} = \frac{df(W)}{dW} \frac{dW}{dW_1} = \frac{df(W_1)}{dW_1}.$$

Como  $\frac{dW}{dW_1} = W_2$ ,

$$W_2 \frac{df(W)}{dW} = \frac{df(W_1)}{dW_1}$$



y multiplicando ambos miembros por  $W_1$ ,

$$W \frac{df(W)}{dW} = W_1 \frac{df(W_1)}{dW_1}.$$

Usando la definición de derivada logarítmica, reescribimos esta igualdad como

$$\frac{df(W)}{d \ln W} = \frac{df(W_1)}{d \ln W_1}.$$

Derivando respecto a  $W_2$ , como el lado derecho no depende de ella, se tiene que

$$\frac{d}{dW_2} \left( \frac{df(W)}{d \ln W} \right) = 0$$

e integrando

$$\frac{df(W)}{d \ln W} = \text{constante} = k$$

o bien

$$df(W) = k d \ln W$$

e integrando de nuevo,

$$f(W) = k \ln W + \text{constante}. \quad (\text{A.2})$$

Pero la ecuación (A.1) exige de manera inmediata que la constante = 0, de donde obtenemos que

$$S = f(W) = k \ln W, \quad (\text{A.3})$$

donde  $k$  es una constante que, puede demostrarse, es la constante de Boltzmann

$$k = \frac{R}{N_0} = 3.2983 \times 10^{-24} \text{ cal/C}$$

$$= 1.38047 \times 10^{-16} \text{ ergios/K.}$$

La ecuación (A.3) es el resultado deseado.

**CAPÍTULO 2**  
**EL ORIGEN DE LA VIDA:**  
**ENTRE EL DETERMINISMO FÍSICO**  
**Y LA CONTINGENCIA HISTÓRICA**

ANTONIO LAZCANO ARAUJO\*  
*Facultad de Ciencias*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

**I. INTRODUCCIÓN**

Aunque son muchos los que creen que el interés de los físicos por el estudio de los fenómenos biológicos comenzó en 1944 con la aparición del libro *What is life?* de Erwin Schrödinger, en realidad la publicación de esta obra representa la culminación de una tendencia intelectual que, si no comienza, al menos se volvió visible con los trabajos de Luigi Galvani en el siglo XVIII. Luego de haber estudiado durante varios años la forma en la que las corrientes eléctricas provocaban contracciones musculares en las piernas de las ranas, aunque éstas estuvieran separadas del cuerpo del animal, Galvani publicó en 1791 un tratado en donde afirmaba que existía una “electricidad animal” que se originaba en el cerebro y recorría el cuerpo de los animales, induciendo el movimiento muscular.

Galvani no era un místico, sino un hijo de la Ilustración. Junto con los trabajos de Le Mettrie y otros

\*alar@ciencias.unam.mx

pensadores de la época, el libro de Galvani se puede leer como el acta de nacimiento de una visión secular de la vida, en donde los soplos divinos y las esencias místicas comenzaron a ser desplazados por fuerzas físicas de carácter secular. Ello se refleja con precisión extraordinaria no tanto en los trabajos científicos de esas épocas, sino en las páginas de *Frankenstein*, el espléndido libro de Mary Wollstonecraft Shelley, que se puede leer no sólo como literatura de horror o de la responsabilidad moral del investigador, sino también como una muestra de la capacidad de inducir, con descargas eléctricas, la vida en un cuerpo inerte formado por retacería de cadáveres (Lazcano, 2008). No en balde la autora de *Frankenstein* escribió, probablemente con la ayuda de su marido el poeta Percy Shelley, que las “investigaciones del doctor Darwin y de los fisiólogos animales han demostrado la factibilidad de lo que allí se describe”. El Darwin al que hace referencia Mary Wollstonecraft Shelley no era otro que el doctor Erasmus Darwin, el abuelo paterno del célebre evolucionista, que había popularizado en el Reino Unido terapias basadas en descargas eléctricas para resolver una serie de problemas de salud, incluidas algunas enfermedades mentales (Lazcano, 2008).

## 2. LA ANTIGÜEDAD DE LA VIDA TERRESTRE

Asombrado por la incapacidad de la mecánica cuántica y los instrumentos matemáticos para explicar la naturaleza de la vida y el enigma de su origen, en 1932 Niels Bohr afirmó que “la existencia de la vida debe ser considerada como un hecho elemental que no puede ser explicado, sino que debe ser visto como el punto de partida de la biología” (Bohr, 1932). Estaba equivocado.

Aunque por esos años apenas se estaban configurando las ideas básicas que habrían de definir las discusiones contemporáneas sobre la origen de la vida, en términos generales, el comentario de Bohr fue ignorado por los biólogos que, por esas épocas, ya estaban generando ideas muy precisas para explicar la aparición de las primeras formas de vida bajo una óptica evolutiva, es decir, histórica.

Aunque a lo largo de su vida Charles Darwin siempre se resistió a discutir en público el origen de la vida, el 1º de febrero de 1871 le escribió a su buen amigo, el botánico Francis Dalton Hooker una carta en donde afirmó que “a menudo se dice que las condiciones necesarias para el surgimiento de la vida aún persisten. Pero sí (y que sí tan grande!) pudiéramos imaginar la presencia en un pequeño charco de agua tibia en donde toda suerte de sales amoniacales y fosfóricas, en presencia de luz, calor, electricidad, etc., de un compuesto proteínico formado químicamente, listo para sufrir cambios más complejos, en la actualidad dicha sustancia sería instantáneamente devorada o absorbida, lo cual no hubiera ocurrido antes de la aparición de la vida”.

¿Y cómo fue que surgió la vida en la Tierra? ¿Existieron los charcos primordiales que Darwin imaginó? ¿Cuándo aparecieron los primeros seres vivos en nuestro planeta? Aunque no sabemos a ciencia cierta cuál es la respuesta a estas preguntas, en los últimos veinte años ha crecido la certeza de que hace unos 3.5 mil millones de años el planeta ya se encontraba poblado por una biósfera microbiana extraordinariamente diversa. Desafortunadamente, el problema más severo que tenemos que enfrentar es el de la ausencia de rocas sedimentarias de más de 3.5 mil millones de años. Es decir, el registro geológico no nos permite, al menos por el momento, reconstruir las condiciones ambientales que tenía la Tierra cuando apareció la

vida: no conocemos cuál era la composición de la atmósfera terrestre, la temperatura de la superficie de nuestro planeta, o la extensión de los mares primitivos. No es de extrañar, pues, que esta situación haya llevado al desarrollo de explicaciones diferentes (e incluso antagónicas) sobre la naturaleza de los primeros seres vivos y los procesos que llevaron a su origen. A pesar de tales incertidumbres, una serie de evidencias que van desde la observación y estudio de las nubes de material interestelar, en donde se están formando estrellas y planetas, hasta la simulación experimental de las condiciones de la Tierra primitiva, sugieren que la vida surgió en nuestro planeta como resultado de la evolución de sistemas de compuestos orgánicos que se acumularon en la superficie del mismo, como resultado de síntesis abióticas y de choques con cometas y meteoritos. Esta idea, que hoy es conocida como la hipótesis heterótrofa del origen de la vida, fue propuesta en 1924 por un joven bioquímico ruso, Alexander I. Oparin, y a pesar de la resistencia con la que se topó inicialmente, lentamente fue ganando impulso hasta transformarse en la mejor explicación de la aparición de la biosfera (Bada y Lazcano, 2009).

### 3. OPARIN Y LA SOPA PRIMITIVA

La publicación en 1859 del libro *El origen de la especies* de Charles Darwin marcó un hito en la historia no sólo de la biología sino del pensamiento occidental mismo. El impacto de la obra de Darwin fue tan poderoso que su influencia muy pronto alcanzó muchas áreas de la cultura, impulsando el desarrollo de ideas e hipótesis que comenzaron a plantearse en el seno de un marco de referencia evolutivo. Aunque no lo dijo en forma explícita,

al igual que Lamarck, Darwin dejaba abierta la posibilidad de que los primeros organismos hubieran surgido como resultado de la generación espontánea.

Algunos de los seguidores de Darwin, como el célebre biólogo alemán Ernst Haeckel, no tardaron en reprocharle su silencio sobre los mecanismos que habían llevado al origen de la vida. Empujado por la sorprendente habilidad de algunos microorganismos como las euglenas, que lo mismo pueden llevar a cabo la fotosíntesis que, en la oscuridad, comportarse como heterótrofos y nutrirse de compuestos orgánicos disponibles en su entorno, Haeckel propuso que los primeros seres vivos habían sido similares a las euglenas; es decir que la vida primigenia había surgido dotada de capacidades fotosintéticas.

No todos aceptaron esta idea. A pesar de la enorme influencia que las enseñanzas de Haeckel habían tenido en el Imperio Ruso, y que se prolongó hasta luego de la revolución que acabó con el régimen zarista, Alexander I. Oparin, un joven bioquímico recién egresado de la Universidad de Moscú, propuso en 1924 que los primeros seres vivos habían sido heterótrofos anaerobios que se formaron y nutrieron a partir de los compuestos orgánicos sintetizados en la Tierra primitiva, y que se habían acumulado en los mares del planeta formando lo que conocemos como la sopa prebiótica. Según Oparin, la formación de las moléculas orgánicas precursoras de los primeros seres había sido posible gracias a la ausencia de oxígeno libre en la atmósfera terrestre, que no se había comenzado a ver en nuestro planeta sino hasta la aparición, muchos millones de años después del origen de la vida, de los primeros microorganismos fotosintéticos.

Aunque las ideas de Oparin se toparon con un cierto rechazo, su discusión quedó limitada en buena medida a

la Unión Soviética —había escrito en ruso, una lengua que pocos científicos occidentales conocían, y las diferencias políticas entre la URSS y los demás países ciertamente no facilitaban su difusión. No fue sino hasta 1938 cuando apareció una edición estadounidense de la obra de Oparin, pero aún así habrían de pasar quince años antes de que se intentara probar experimentalmente la validez de su teoría (cf. Bada y Lazcano, 2009).

#### 4. LA QUÍMICA PREBIÓTICA

En 1952 apareció publicado un artículo sobre la evolución de la atmósfera terrestre escrito por Harold C. Urey, un distinguido químico estadounidense que había recibido el premio Nobel por su descubrimiento del deuterio y que se encontraba por ese entonces en la Universidad de Chicago. Ese mismo año Stanley L. Miller, un joven estudiante que había comenzado sus estudios de doctorado en dicha institución, escuchó a Urey hablar de sus modelos de la Tierra primitiva, y al cabo de unas cuantas semanas se le acercó y le pidió que lo asesorara para llevar a cabo una simulación de los procesos químicos que habían llevado a la síntesis de compuestos orgánicos necesarios, según las ideas de Oparin, para la aparición de la vida. Aunque a Urey no le gustó el proyecto, eventualmente aceptó dirigir a Miller, el cual puso manos a la obra diseñando un aparato relativamente simple en donde se simulaban la Tierra primitiva con todo y descargas eléctricas. El aparato construido por Miller estaba lejos de corresponder a la compleja estructura de los ambientes terrestres primitivos. Sin embargo, al someter a la acción de descargas eléctricas una mezcla de gases formada por metano, amoníaco, hidrógeno y vapor de

agua, Miller pudo observar cómo se formaban aminoácidos, hidroácidos, urea y otras moléculas de interés bioquímico.

El interés que despertaron los resultados reportados por Miller fue extraordinario: bastaban unos cuantos días para obtener, en condiciones que parecían simular las de la Tierra primitiva, algunos de los compuestos esenciales para la vida. El trabajo de Miller, que fue publicado en 1953, apareció pocas semanas después que el modelo de la doble hélice del DNA de Watson y Crick, y en rigor inauguró el estudio experimental del origen de la vida. Muy pronto fue seguido por otros experimentos similares, dando origen a lo que hoy en día conocemos como química prebiótica. Sin duda alguna el avance más significativo en este campo no ocurrió sino hasta 1960, cuando Joan Oró, un químico catalán vecindado en Houston, demostró que la condensación de cinco moléculas de ácido cianhídrico (HCN), una molécula que se formaba con facilidad en el experimento de Miller y que está presente en las nubes de material interestelar y en los núcleos de cometas, se condensaban formando la adenina, una de las bases nitrogenadas presentes en el DNA, el RNA y el ATP, un nucleótido relativamente simple que juega un papel esencial en el metabolismo de todos los seres vivos.

A lo largo de los últimos cincuenta años los resultados de los trabajos de Miller y Oró han sido confirmados por muchos otros investigadores, y han permitido demostrar la facilidad con la que podemos sintetizar las pirimidinas (que son las bases complementarias a las purinas, la categoría a la cual pertenece la adenina), azúcares, lípidos y muchas moléculas más de interés biológico. Podemos obtener compuestos catalíticos que ayudan a unir aminoácidos, cadenas de nucleótidos, y hasta moléculas lipídicas,

que, en contacto con el agua, forman sistemas conocidos como las micelas y los liposomas, que poseen en su interior un medio acuoso y que pueden haber sido precursores de las células actuales. Aunque carecemos de evidencias directas de la existencia de la sopa primitiva, la eficiencia con la que se pueden formar un gran número de monómeros bioquímicos y, en algunos casos, de oligómeros como péptidos relativamente simples, ciertamente apoya las ideas de Oparin.

Existe una evidencia adicional que puede ser utilizada para apoyar la hipótesis de la existencia de una sopa primitiva. En septiembre de 1969 cayó en Australia un meteorito que resultó ser de 4.6 mil millones de años, es decir, de la misma edad que la Tierra y el resto del sistema solar. Este pequeño cuerpo, que hoy conocemos como el meteorito de Murchison, fue analizado en los laboratorios que se habían montado para estudiar las muestras lunares. Los resultados de estos estudios han sido espectaculares: el meteorito Murchison posee hidrocarburos tanto lineales como aromáticos, pero también cerca de ochenta aminoácidos, bases púricas y pirimidicas, ácidos carboxílicos, moléculas capaces de formar membranas de doble capa y compuestos derivados de azúcares, entre muchos otros. Aunque carecemos de una muestra de la sopa primitiva, el análisis del Murchison nos dice que hace 4.6 mil millones de años, cuando se estaban formando la Tierra y otros planetas, en el sistema solar ocurrían una serie de procesos químicos que permitían la síntesis y acumulación de compuestos orgánicos, lo cual ciertamente apoya la idea de que en nuestro planeta ocurrían procesos similares. Más aún, la caída del Murchison sugiere que la sopa primitiva pudo haber sido sazonada con material orgánico extraterrestre que llegó a nuestro planeta a bordo de cometas, meteoritos y aste-

roides, enriqueciendo el medio ambiente prebiótico con una enorme cantidad y diversidad de moléculas de importancia bioquímica (Bada y Lazcano, 2009).

## 5. EL MUNDO DEL RNA

Aunque no sabemos cómo surgió la vida, tanto los experimentos que simulan la Tierra primitiva como el análisis de meteoritos similares al Murchison permiten suponer que antes de que apareciera la vida ya existían en nuestro planeta (a) cantidades importantes de compuestos orgánicos de origen prebiótico, incluyendo muchos monómeros de importancia bioquímica; (b) una diversidad considerable de catalizadores, tanto orgánicos como inorgánicos, incluyendo cationes metálicos, minerales y arcillas; (c) purinas y pirimidinas, es decir, el potencial para polimerizaciones molde-dirigidas, como las que ocurren durante la replicación de ácidos nucleicos; y (d) moléculas lipídicas capaces de formar membranas. Se trata, visto en conjunto, de compuestos y propiedades que asociamos con fenómenos biológicos.

¿Cómo se dio la evolución de la vida a partir de la sopa primitiva? Luego de que el modelo de la doble hélice del DNA de Watson y Crick fue aceptado, y de que se comprendió que las secuencias de los aminoácidos de las proteínas se encuentran codificadas en el DNA mismo, el campo del origen de la vida se dividió en dos grandes grupos. En un lado se encontraban los que sostenían que lo primero en surgir había sido el DNA, que se replica y almacena la información genética, pero había un grupo igualmente numeroso que sostenía que las proteínas habían aparecido primero, ya que son los catalizadores más conspicuos de los procesos bioquímicos básicos y que

son indispensables para la replicación misma de los ácidos nucleicos. Es cierto que había quienes sugerían que los primeros seres vivos habían resultado de la coevolución de ambos tipos de moléculas, pero esta alternativa tampoco parecía resolver el problema.

No fue sino hasta 1967 cuando Carl Woese sugirió que antes que el DNA y las proteínas había surgido el RNA, una idea que también fue propuesta un año más tarde de manera independiente por Francis Crick y Leslie Orgel. A pesar del enorme prestigio de estos tres científicos, muchos desdeñaban esta posibilidad por considerarla una especulación sin fundamento. No fue sino hasta 1982 cuando los grupos de Thomas Cech y Sidney Altman descubrieron, de manera casi accidental, que en efecto el RNA poseía propiedades catalíticas; es decir, es un ácido nucleico que puede almacenar información genética, pero también se comporta como las proteínas y cataliza diversas reacciones bioquímicas.

El descubrimiento de la existencia de moléculas de RNA catalítico, también llamadas ribozimas, ha permitido conceptualizar el llamado mundo del RNA y diseñar experimentos que simulan lo que pudo haber ocurrido en la Tierra primitiva. Por ejemplo, se han aislado ribozimas que pueden leer cadenas sencillas de RNA y formar una cadena complementaria, lo cual demuestra que, en principio, se podría haber obtenido la replicación del RNA en ausencia de enzimas. A partir de moléculas como ésta, recientemente Lincoln y Joyce desarrollaron un sistema experimental en donde una ribozima cataliza su propia replicación, lo que permite acumular copias de sí misma (Lincoln y Joyce, 2009). Hay algunos investigadores, como Jack Szostak, por ejemplo, que han logrado introducir ribozimas al interior de liposomas que empiezan a funcionar como pequeños reactores químicos y polimerizan nucleótidos (Mansy *et al.* 2008).

La caracterización de las propiedades de las ribozimas ha modificado en forma profunda varios conceptos de la biología molecular al demostrar, por ejemplo, que la formación del enlace peptídico que une a los aminoácidos en el interior del ribosoma es catalizada no por las proteínas ribosomales, sino por el RNA mismo. Desde una óptica evolutiva, estos resultados tienen implicaciones profundas. Por una parte, simplifican enormemente el estudio del origen de la vida, ya que vuelven plausible la idea de un mundo de RNA, en donde la catálisis de procesos ancestrales dependía de ribozimas, y al mismo tiempo indican, por ejemplo, que la síntesis de proteínas (y el código genético mismo, en consecuencia) es un producto de la evolución del mundo del RNA.

Sin embargo, al mismo tiempo estos descubrimientos nos plantean dudas nuevas. Sabemos que el RNA es una molécula extraordinariamente inestable, y que sus propiedades catalíticas y replicativas difícilmente pudieron haber aparecido repentinamente en los mares primitivos. ¿De dónde surgió el mundo del RNA? Aunque es posible que existan procesos químicos aún desconocidos que faciliten la formación de moléculas de RNA y que lo estabilicen, una idea que ha comenzado a extenderse entre muchos de quienes se dedican al estudio del origen de la vida es la de que el RNA pudo haber sido precedido por mundos más sencillos, es decir, que el RNA mismo sea el producto de la evolución de biósferas basadas en mundos de pre-RNA que dependían de moléculas catalíticas formadas por compuestos que podían almacenar información genética pero que no eran ni DNA ni RNA. Aunque no sabemos si esta posibilidad es correcta, el poder plantearla es un ejercicio intelectual extraordinario que puede tener consecuencias científicas (y prácticas) de enorme importancia. Y, por supuesto, este tipo de ejercicios son

precisamente uno de los factores que vuelven tan atractivo el aproximarse a problemas centrales de la ciencia como el del origen de la vida.

La posibilidad de que la síntesis de proteínas haya surgido en el mundo de RNA se ve apoyada por una serie de evidencias moleculares de enorme peso, entre las que destacan las muchas interacciones que se conocen entre distintos aminoácidos y las ribozimas. Sin embargo, la evidencia más impresionante proviene de la estructura misma de los ribosomas, los organelos celulares en donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas. Al dilucidar la estructura cristalina de los ribosomas, quedó perfectamente claro que el sitio en donde se lleva a cabo la formación del enlace peptídico entre dos aminoácidos es un lugar en donde no hay proteínas ribosomales, sino únicamente RNA; es decir, es el RNA mismo el que está catalizando la formación de cadenas de aminoácidos, lo que implica que estamos atestiguando la preservación evolutiva, por un periodo de casi cuatro mil millones de años, de una propiedad de las ribozimas que nos indica que la síntesis de proteínas surgió en un mundo en donde el RNA era el principal catalizador biológico, y que dio origen a células que aún carecían de DNA.

¿Cuándo y cómo surgió el DNA? A diferencia del RNA, que es una molécula de una enorme fragilidad, la doble hélice del DNA se caracteriza por estabilidad química considerable. Esta propiedad, de hecho, nos permite entender su origen, ya que el almacenar la información genética en un polímero poco reactivo aumenta considerablemente la fidelidad de su transmisión hereditaria. Los mecanismos de síntesis del DNA están extraordinariamente conservados entre todos los organismos estudiados, lo cual sugiere que la línea biológica ancestral de donde surgieron las especies contemporáneas estaba formada

por células que ya poseían DNA, RNA y proteínas. La vida, tal como la conocemos hoy en día a nivel bioquímico, evolucionó en forma tan rápida, que todo indica que hace unos tres mil quinientos millones de años muchos de los mecanismos moleculares ya habían surgido. La extraordinaria diversidad biológica que vemos no sólo en los seres vivos actuales, sino también en los registros fósiles, nos habla del poder de adaptación y diversificación de estos ancestros de donde todos descendemos (Bada y Lazcano, 2009).

## 6. CAOS, COMPLEJIDAD Y AUTOORGANIZACIÓN

Antes de que se descubrieran las ribozimas un número considerable de investigadores estaban convencidos de que el origen del código genético era equivalente al origen de la vida misma. Ello dio como resultado, siguiendo una tradición inaugurada de manera indirecta por Gamow y el propio Schrödinger, a un número enorme de trabajos que, vistos en perspectiva, se antojan como ejemplos refinados de numerología pitagórica. Sin embargo, la búsqueda de principios generales que pudieran servir para explicar lo mismo fenómenos físicos complejos que el surgimiento y la naturaleza de la vida visible se ha vuelto muy visible entre algunos teóricos contemporáneos y ha dado origen a una tendencia muy peculiar para explicar el origen de los primeros organismos.

Con excepciones como las de Sydney W. Fox y otros autores, durante los años que siguieron al experimento de Miller el estudio del origen de la vida se definió, en buena medida, por el desarrollo de la biología molecular, que fue demostrando los mecanismos moleculares que subyacen la replicación del DNA y la síntesis de proteínas.



Es en este contexto en donde se deben entender las propuestas pioneras de Woese, Orgel y Crick sobre el mundo del RNA. A pesar del enorme éxito predictivo de esta hipótesis, y de las muchas evidencias que demuestran que, en efecto, durante etapas tempranas de la evolución el RNA jugó un papel mucho más conspicuo, existe un grupo de investigadores no necesariamente dotado de una gran coherencia interna pero ciertamente muy audible, que sostiene que las primeras formas de vida se pueden entender no como el resultado de un proceso evolutivo, sino como entidades que carecían de material genético y que resultaron de las propiedades de autoorganización que se observan en sistemas complejos. Esta corriente científica, que suele negar el papel de la selección natural y de la evolución darwinista, sugiere la primacía de las rutas metabólicas, no desciende de las propuestas de Oparin, sino que tiene parte de sus raíces científicas en los trabajos de D'Arcy Thompson, Schrödinger y Prigogine, entre otros, y en algunos de sus representantes contemporáneos como Stuart Kauffman, Freeman Dyson y Pier Luigi Luisi (Lazcano, 2007).

En 1993, por ejemplo, Kauffman publicó un libro llamado *The origins of order: self organization and selection in evolution*, cuyo título resume la idea de que la vida es el resultado inexorable de una transición de fase de sistemas complejos autocatalíticos cuyo origen no requirió de material genético. Si bien es cierto que la obra de Kauffman está dotada de un aparato matemático muy elaborado, sus propuestas teóricas ni toman en cuenta las propiedades específicas de los compuestos que pudieron haberse formado en la Tierra primitiva, ni permite predicciones específicas que pudieran dar lugar a demostraciones experimentales. Aunque Kauffman afirma que las propiedades de los polímeros genéticos son un caso

particular de las propiedades de sistemas complejos, diversos autores han señalado cómo su modelo está lastrado por una serie de inconsistencias y suposiciones erradas sobre las concentraciones de compuestos orgánicos o las probabilidades de sus reacciones químicas en la Tierra primitiva.

Como lo resumió Farmer (2005) la autoorganización es una propiedad que ha sido descrita en muchas disciplinas, como los autómatas celulares descritos por Turing, en sistemas disipativos como las celdillas de Barnard, en líquidos que comienzan a hervir y los patrones complejos en los que se observan flujos laminares, en reacciones químicas cíclicas como la de Belousov-Zhabotinsky y en bicapas, micelas y liposomas que forman fácilmente los lípidos. Es cierto que todos estos sistemas presentan algunas propiedades en común (como la de ser termodinámicamente abiertos) y de acuerdo con la opinión de muchos teóricos de la complejidad, indican la existencia de principios físicos que corresponden a leyes de validez universal. El problema, como lo han subrayado diversos autores (Farmer, 2005; Lazcano, 2007) es que tales principios, si de verdad existen, aún no se descubren. Ello no ha evitado que algunos investigadores sigan sosteniendo que la naturaleza de la vida y su origen mismo se deben ver como un sistema complejo capaz de renovarse a sí mismo, resultado de la autoorganización de ciclos metabólicos que carecían de polímeros genéticos.

No cabe duda de que la vida es un sistema complejo y que algunas de sus propiedades se pueden explicar desde la óptica de la autoorganización. Por ejemplo, Pier Luigi Luisi y sus colaboradores prepararon micelas sintéticas formadas por ácido caprílico, que contenían hidróxido de litio y que estaban estabilizadas por un derivado del ácido octanoico. El sistema mostró propiedades insospechadas: al hidrolizarse uno de los compuestos pre-

sentes, se formaba más ácido caprílico, que se incorporaba a las micelas, haciéndolas crecer y, eventualmente, multiplicarse. Estos ciclos de replicación continuaban por unas cincuenta generaciones, y aunque el tamaño de las micelas eventualmente disminuía, demostraban que la replicación molecular no es exclusiva de los ácidos nucleicos (Bachmann *et al.* 2002).

Aunque las micelas de Luisi se replican, no se reproducen. Es decir, no transmiten información genética de generación en generación. A diferencia de los ácidos nucleicos, son sistemas autocatalíticos no informacionales y, por lo tanto, ni transmiten información genética ni son susceptibles de evolucionar (Orgel 1992). No cabe duda de que la autoorganización de los lípidos juega un papel esencial en los seres vivos y que una vez que se sintetizan no se requiere de información genética para que se incorporen a las membranas celulares —pero la biosíntesis de los lípidos depende de enzimas codificadas por genes que tienen atrás una historia evolutiva. Como lo demuestran las diferencias químicas en los lípidos de las membranas de las arqueas y las bacterias, no se puede desdeñar el papel de la contingencia histórica en la evolución de los organismos.

## 7. CONCLUSIONES

Nunca sabremos cómo surgió la vida. La ausencia de rocas sedimentarias del arqueano temprano, el periodo geológico que comenzó con la formación de la corteza y el origen de la hidrósfera, nos impide conocer las condiciones ambientales que existían en el planeta al aparecer los primeros organismos. Al igual que ocurre en otras disciplinas científicas, como la cosmología, la planetología y

la geología, el estudio del origen de la vida como parte de la biología evolutiva, es una disciplina de carácter histórico. Es decir, intenta construir narrativas que permitan reconstruir los eventos del pasado, a veces lamentablemente de manera muy general, que sean consistentes no solamente con las características esenciales de los organismos contemporáneos, sino también con las restricciones físicas y las condiciones químicas que pudieron haber existido en el planeta. Aunque existen enormes lagunas en nuestro conocimiento, la facilidad con la que se pueden sintetizar monómeros orgánicos de importancia bioquímica, su presencia en meteoritos pétreos, las evidencias que apuntan hacia la existencia del mundo del RNA, y las evidencias genómicas que nos permiten asomarnos a épocas anteriores al origen del DNA, nos han permitido ir refinando un esquema evolutivo para entender las grandes etapas de la evolución hasta llegar a las células actuales.

Como alguna vez escribió Stephen Jay Gould, para entender la naturaleza de la vida misma, debemos reconocer tanto los límites impuestos por las leyes de la física y la química, como el papel de la contingencia histórica (Gould, 1995). Es obvio que las lecciones de las grandes corrientes de la física contemporánea, como las derivadas del estudio de los sistemas complejos y los fenómenos de autoorganización nos permiten entender algunos de los procesos que llevaron a la aparición de la vida —pero no son suficientes. A pesar del refinamiento teórico y de las explicaciones matemáticas, las ideas de emergencia, complejidad y autoorganización dan explicaciones extraordinariamente limitadas del origen de la vida. Hay que reconocer, como lo hizo Evelyn Fox-Keller hace algunos años (2002), que la pretensión, hasta ahora fallida, de explicar la naturaleza de la vida a partir de

leyes y principios de aplicación universal, es parte de una tradición extraordinariamente sólida entre los físicos pero que no forma parte de la metodología de la biología evolutiva. Ello no hace al estudio de la evolución menos maduro intelectualmente que la física teórica, sino que demuestra que existen metodologías y premisas específicas para cada disciplina científica. Las ideas de la complejidad tienen antecedentes directos, como la teoría de catástrofes, el estudio de sistemas disipativos, los fractales y el caos, ninguno de los cuales por sí mismo responde a todas las preguntas que nos hacemos sobre la aparición de la vida. Lo más prudente, desde el punto epistemológico, es ver las generalizaciones de la física contemporánea sobre la naturaleza de la vida, como invitaciones al trabajo multidisciplinario y no como verdades absolutas.

#### REFERENCIAS

1. Bachmann P. A., P. L. Luisi y J. Lang, *Autocatalytic self-replicating micelles as models for prebiotic structures*, *Nature* **357**, pp. 57-59 (2002).
2. Bada J. y Lazcano A., *The origin of life*. M. Ruse y J. Travis (eds.), *The Harvard Companion of Evolution* (Belknap/Harvard University Press, Cambridge, MA) pp. 49-79 (2009).
3. Bohr N., *Light and life*. *Nature* **131**, pp. 421-423 (1932).
4. Farmer D. J., *Cool is not enough*. *Nature* **436**, pp. 627-628 (2005).
5. Fox Keller E., *Making Sense of Life: explaining biological development with models, metaphors, and machines*. Harvard University Press (Cambridge, Mass., EUA) (2002).
6. Gould S. J., *What is life? as a problem in history*; M. P. Murphy y L. A. J. O'Neill (eds.), *What is Life? The next fifty years* (Cambridge University Press, Cambridge) pp. 25-39 (1995).
7. Lazcano, A., *Prebiotic evolution and the origin of life: is a system-level understanding feasible?*, I. Rigoutsos y G. Stephanopoulos (eds.) *Systems Biology* (Oxford University Press, New York) pp. 57-78 (2007).

8. Lazcano A., *What is life? A brief historical overview*, *Chemistry and Biodiversity* **5**, pp. 1-15 (2008).
9. Lazcano A., *Which way to life? Origins Life Evol. Biosph.* (enviado al comité editorial) (2009).
10. Lincoln, T. A. y Joyce G. F., *Self-sustained replication of an RNA enzyme*, *Science* **232**, pp. 1229-1232 (2009).
11. Mansy S. S., Schrum J. P., Krishnamurthy M, Tobé S, Treco D. A, Szostak J. J. W., *Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell*, *Nature* **454**, pp. 122-125 (2008).
12. Orgel L. E., *Molecular replication*, *Nature* **358**, pp. 203-206, (1992).

## CAPÍTULO 3 EL DNA

PEDRO MIRAMONTES\* y ARTURO BECERRA  
*Facultad de Ciencias*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

### 1. INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico (DNA<sup>1</sup>) ocupa actualmente un lugar importante entre los sectores de la población que tienen acceso a los medios de comunicación y su amplia difusión lo ha hecho incorporarse ya como parte de la cultura contemporánea. Lo mismo en la prensa que en el sector de entretenimiento de los medios electrónicos, se habla de las pruebas de DNA para determinar paternidad o parentesco, de las huellas o firmas genómicas para uso policiaco o forense, de la secuenciación del genoma de especies con importancia científica o comercial, de los riesgos de la propagación sin control de los organismos transgénicos y muchos otros casos. Sin embargo, el alto porcentaje de aparición del término "DNA" no asegura, ni con mucho, su uso correcto; aun

<sup>1</sup> Aunque las siglas en español son ADN, se acepta internacionalmente el uso de DNA más como un símbolo, análogo al de los elementos de la tabla periódica, que como las siglas del ácido desoxirribonucleico en inglés.

\* pmv@ciencias.unam.mx

en programas o escritos de divulgación científica es frecuente encontrar expresiones tales como "se descifró el genoma de la especie XXX" o bien "se ha encontrado el código genético de la especie YYY" expresiones de las que, como se verá a lo largo de este capítulo, lo más amable que se puede decir es que son totalmente erróneas.

Una de la motivaciones principales de este capítulo es presentar de manera sucinta un panorama amplio del DNA, tanto de su estructura como de su función, para que los lectores con una formación profesional en disciplinas distintas a la biología encuentren respuestas a interrogantes que surgen en la vida cotidiana con respecto a una molécula que ha recibido considerable atención desde que, en 1953, James Watson y Francis Crick descubrieron su estructura tridimensional. Haremos un recorrido histórico, desde el descubrimiento del DNA en la segunda mitad del siglo XIX, hasta la fecha. A continuación se dará una descripción somera de algunas características generales y de la fenomenología del DNA que después serán tratadas con mayor profundidad.

Posteriormente dedicaremos un espacio a la discusión de la estructura del DNA desde la escala de moléculas pequeñas, con unos cuantos átomos, hasta los cromosomas varios órdenes de magnitud más grandes. En la siguiente sección se hace una descripción detallada de la función del DNA en los muy conocidos procesos de duplicación, traducción y replicación y también se muestran resultados recientes sobre la función de la mal llamada DNA basura. Cerramos el capítulo con una presentación de algunos de los usos modernos del DNA para aplicaciones tanto prácticas, como en aspectos forenses y de identificación de parentesco, así como teóricas como lo son las propuestas recientes de cómputo molecular con DNA.

El DNA es un polímero cuyos monómeros se llaman *nucleótidos*. Cada nucleótido tiene un tamaño aproximado (hay cuatro tipos distintos) de 0.33 nanómetros (un nanómetro es la milmillonésima parte de un metro; es decir  $10^{-9}$ m). Al polímero completo, el total de DNA de un organismo, se le llama *genoma*. El DNA de cada organismo puede ir de algunos miles de nucleótidos en el caso de los virus, hasta billones para ciertas clases de anfibios y la ameba *Chaos chaos*. Entre estos extremos se puede contar a las bacterias que tienen del orden de millones de nucleótidos y a los humanos con un orden de magnitud de mil millones.

Todos los organismos están incluidos dentro de dos categorías; los procariontes y los eucariontes. Los primeros son células sin núcleo y su molécula de DNA se encuentra libre en el citoplasma y normalmente está organizado como un solo cromosoma circular; mientras que en el caso de los segundos, el genoma está confinado en el núcleo celular y poseen uno o varios cromosomas lineales. Los organelos de los organismos eucariontes, mitocondrias en el caso de animales y cloroplastos en el de plantas, poseen también pequeños cromosomas. Todas las bacterias y las arqueas son procariontes mientras que todos los organismos multicelulares, los protistas (protozoarios) algas y hongos unicelulares son eucariontes. En la tabla 1 se muestra a manera de ejemplo el promedio aproximado del tamaño del genoma de algunos grupos de organismos eucariontes, las cifras son millones de nucleótidos.

En lo que a los procariontes se refiere, las arqueas van aproximadamente de 0.5 a 10 millones de nucleótidos siendo *Nanoarchaeum equitans* el organismo con el genoma más pequeño conocido hasta la fecha. Las bacterias van de 0.6 a 10 millones de nucleótidos y la bacteria con

el genoma más pequeño es *Mycoplasma genitalium*. Cabe mencionar que esta última es un parásito obligado y que *Nanoarchaeum* es un exosimbionte, también obligado, por lo que varias de sus funciones metabólicas las lleva a cabo el hospedero.

Vale la pena comentar que el tamaño de los genomas se suele medir también en unidades de masa. En este caso su orden de magnitud indica el uso de picogramos (10<sup>-12</sup> gramos). Un picogramo de DNA equivale aproximadamente a 978 000 bases o, lo que es lo mismo, 978 megabases (Mb). Cuando el tamaño de cada genoma se mide en unidades de masa se le denomina *C-value*.

Tabla 1

PROMEDIO DEL TAMAÑO DEL GENOMA EN DISTINTOS GRUPOS DE ORGANISMOS\*

Clorofitas	1652	Aves	1467
Rodofitas	400	Mamíferos	3423
Licofitas	1907	Insectos	1565
Gimnospermas	18903	Crustáceos	3032
Angiospermas	6367	Arácnidos	2347
Peces sin mandíbulas	2248	Moluscos	1760
Peces cartilaginosos	5575	Equinodermos	1271
Peces pulmonados	88411	Anélidos	1467
Anfibios	16632	Gusanos planos	2054
Reptiles	2249	Nemátodos	196

\* Las cifras representan millones de bases.

## 2. HISTORIA DEL DNA

En 1869, Friedrich Mieschner trabajaba en el laboratorio de Felix Hoppe-Seyler, en la Universidad de Tubinga en el sur de Alemania. Este laboratorio tenía una gran reputación pues el uso de técnicas y herramientas de la física moderna para el estudio de la bioquímica había arrojado resultados impresionantes en aquel entonces. Ahí se habían detectado por primera vez dos bandas muy claramente marcadas en el espectro de absorción del pigmento de la sangre y se obtuvieron cristales de hemoglobina. Mieschner, nacido en Basilea, Suiza, recibió el encargo de estudiar la química de los núcleos de leucocitos que obtenía de la pus de los vendajes desechados de los heridos del hospital universitario. Aunque su intención era la búsqueda de las proteínas constituyentes del núcleo, la sustancia que obtuvo en un precipitado de glóbulos blancos tratados con una solución alcalina tenía propiedades que diferían de las de una proteína. Mieschner bautizó a esta sustancia como *nucleína*.

Posteriormente, en los años treinta del siglo pasado, el ruso emigrado a los Estados Unidos Phoebus Levene demostró que la nucleína contenía adenina, guanina, timina, citosina, desoxirribosa y un grupo fosfato y que, consecuentemente, la nucleína era un ácido desoxirribonucleico. Aproximadamente diez años después Erwin Chargaff, también emigrado a los Estados Unidos pero de origen austríaco, descubrió la "equimolaridad" de las bases ( $[A]=[T]$  y  $[G]=[C]$ ), la llamada "primera ley de Chargaff". La segunda ley de Chargaff dice que la composición del DNA (el cociente  $(G + C)/(A + T)$ ) varía de especie a especie.

En 1952, los estadounidenses Martha Chase y Alfred Hershey demostraron que el DNA es la base material de

la herencia contradiciendo la creencia aceptada por muchos científicos de que el material genético consistía de proteínas. Casi simultáneamente, en la Gran Bretaña, Rosalind Franklin obtuvo excelentes imágenes de difracción de rayos X del DNA (figura 1), las cuales fueron esenciales para que poco después, en 1953, el británico Francis Crick y el estadounidense James Watson determinaran la famosa estructura de doble hélice del DNA (figura 2) de la cual hablaremos con mayor profundidad en la siguiente sección.

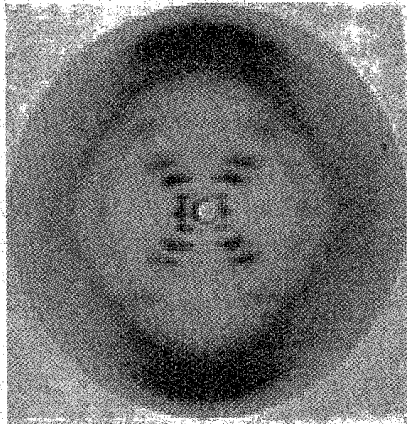


Figura 1. Imagen de la difracción de rayos X de una muestra de DNA obtenida por Rosalind Franklin y en la que se basaron J. Watson y F. Crick para deducir la estructura tridimensional

### 3. ESTRUCTURA DEL DNA

Como se mencionó en la introducción, el DNA es un polímero cuyos monómeros son los *nucleótidos*, los cuales están compuestos de una parte variable y de otra que es constante. La parte variable es una base nitrogenada,

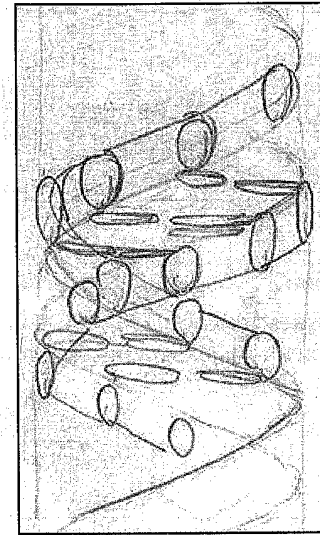


Figura 2. Bosquejo original de la estructura del DNA por F. Crick.

pues puede ser de cuatro tipos distintos, y la parte constante se compone del azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato. El conjunto de la base nitrogenada más el azúcar se conoce como *nucleósido*. Otra característica de la desoxirribosa es que es una pentosa, es decir que es un azúcar con cinco átomos de carbono, lo cual es significativo ya que el enlace fosfodiéster se da entre el carbono 3' del azúcar con el grupo fosfato y el carbono 5' del siguiente azúcar. Sin embargo, como en el DNA las hebras son antiparalelas, es decir las hebras son paralelas pero tienen diferente dirección, una hebra es 3'-5', mientras que la otra es 5'-3'. En el DNA hay cuatro bases nitrogenadas distintas, por lo que se habla de cuatro nucleótidos como bloques constituyentes del DNA. Las bases pueden ser *adenina*, *citosina*, *guanina* y *timina* (figura 3). Los respectivos nucleósidos se llaman *adenosina*, *citidina*, *guanosina* y *5-metiluridina*. En la figura 4 se muestra el nucleósido con timina.

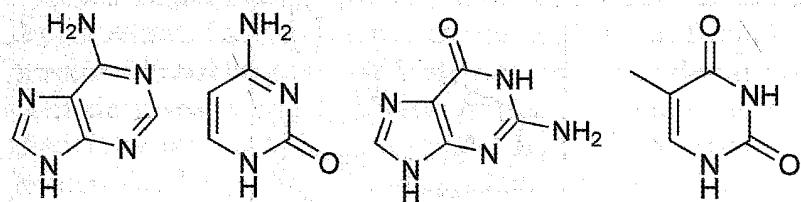


Figura 3. Las cuatro bases nitrogenadas. En el orden acostumbrado: adenina, citosina, guanina y timina.

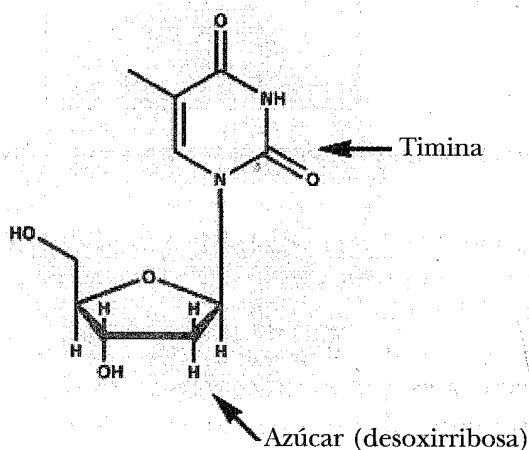


Figura 4. La base nitrogenada timina con el azúcar desoxirribosa.

A su vez, las bases nitrogenadas se pueden agrupar en purinas (adenina y guanina) y pirimidinas (citosina y timina) como se aprecia en la figura 5, las purinas son moléculas que constan de dos anillos mientras que las pirimidinas tienen sólo uno.

Debido a la geometría y a las propiedades fisicoquímicas de purinas y pirimidinas, es posible la formación de parejas o pares de bases que se unen mediante puentes

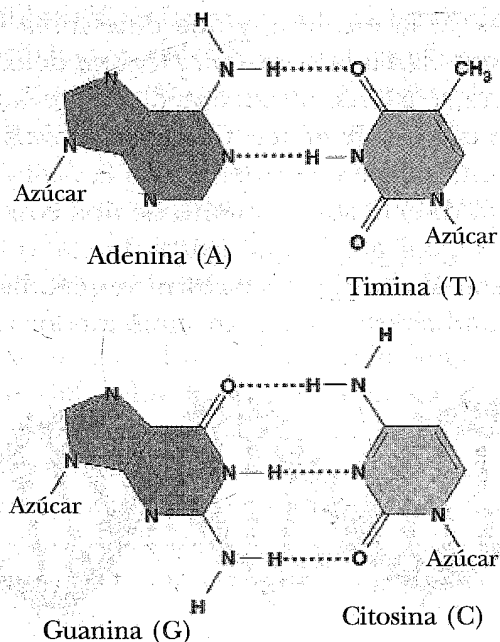


Figura 5. La adenina y la guanina son bases "grandes" (purinas) mientras que la timina y la citosina son "pequeñas" (pirimidinas). Para mantener constante el ancho del dúplex, es necesario que el complemento de una purina sea una pirimidina.

de hidrógeno. Los pares de bases que existen son de adenina con timina, mediante dos puentes de hidrógeno, y de citosina con guanina mediante tres puentes de hidrógeno. Los pares de bases siempre son purina-pirimidina o pirimidina purina. Gracias a este principio de complementariedad, una vez que se tiene un polímero de nucleótidos, éste se puede acoplar con el complementario y formar un bipolímero (o doble polímero) en forma de escalera, en el cual los pasamanos son los grupos fosfato y la desoxirribosa mientras los peldaños son las bases nitrogenadas en pares (figura 6). A la secuencia de nucleótidos en una



de las ramas de la escalera, y que determina la complementaria, se le llama la *estructura primaria* del DNA.

La escalera se tuerce alrededor de su eje longitudinal para formar una doble hélice. Cada pasamanos de la escalera forma una hélice congruente con la otra y tienen un eje común pero el desplazamiento de una con respecto a la otra no es igual por lo que existe un surco mayor que deja expuestas al exterior las bases nitrogenadas y, en consecuencia, también se aprecia un surco menor (figura 7).



Figura 6. Modelo de la doble hélice del DNA.

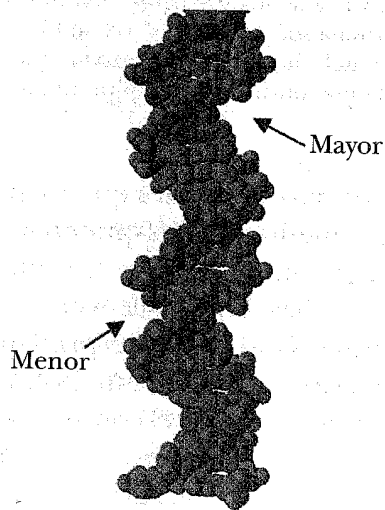


Figura 7. El paso de las dos hebras de DNA no es constante sino que define un surco mayor y un surco menor señalados con las flechas.

La doble hélice formada por el torcimiento de la estructura primaria del DNA y su complemento, recibe el nombre de *estructura secundaria*. Estudios de difracción de rayos X han revelado la existencia de más de una posible conformación de la estructura secundaria. A alta salinidad la estructura dominante se llama A-DNA y a baja salinidad B-DNA. Posteriormente se encontró una tercera conformación a la que se le dio el nombre de Z-DNA (figura 8). La forma B-DNA es la que comúnmente se encuentra *in vivo*. En ella la doble hélice se tuerce en dirección del reloj (es una molécula dextrógira), los pares de bases son casi perpendiculares al eje de la doble hélice (en realidad forman un ángulo cercano a los cuatro grados), cada par de bases se encuentra girado  $36^\circ$  con respecto al adyacente, la doble hélice se repite cada 3.4nm (aproximadamente 10 bases) y el surco mayor mide 2.2nm, mientras que el menor mide 1.2nm. El diámetro del cilindro que contendría la doble hélice y que tendría el mismo eje mide 2nm de diámetro.

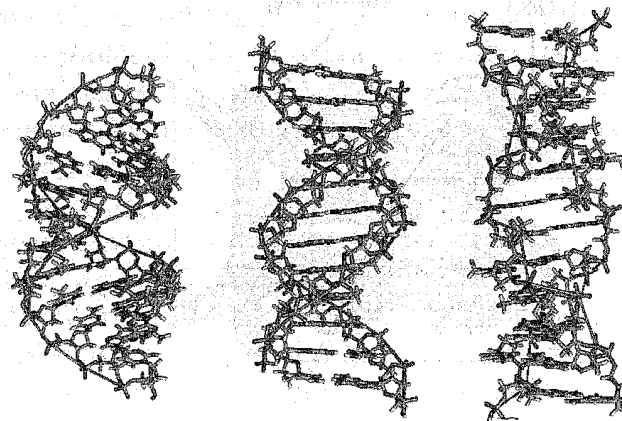


Figura 8. Las tres configuraciones conocidas del DNA: A-DNA, B-DNA y Z-DNA (ver el texto).

En las células con núcleo, los eucariontes, el DNA tiene una organización geométrica adicional que no se encuentra en los procariontes, células sin núcleo, y se trata de una familia de proteínas llamadas *histonas*. La familia está compuesta por las histonas H1, H2a, H2b, H3 y H4. Dos copias de H2a, H2b, H3 y H4 forman un núcleo de ocho moléculas alrededor del cual un hilo de 146 pares de bases de la doble hélice del DNA se enrolla. La estructura es asegurada por una molécula H1 (figura 9) que actúa como un broche de seguridad para darle estabilidad al complejo. Estas unidades de histonas con DNA se llaman *nucleosomas*, son configuraciones elipsoidales que miden aproximadamente 11nm de largo y 6 de altura. El resultado es que un hilo de DNA se encuentra interrumpido por estas "cuentas" para formar una suerte de rosario.

El collar a su vez se enrolla sobre un eje imaginario para dar lugar a la estructura conocida como *cromatina*.

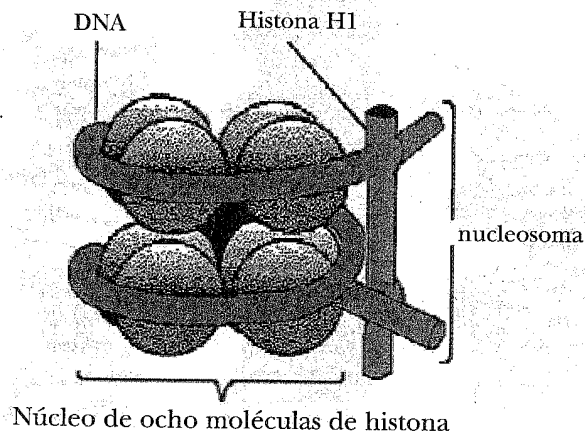


Figura 9. La doble hélice (en rojo) se enrolla alrededor de las histonas y la configuración es estabilizada por la histona H1 (en verde).

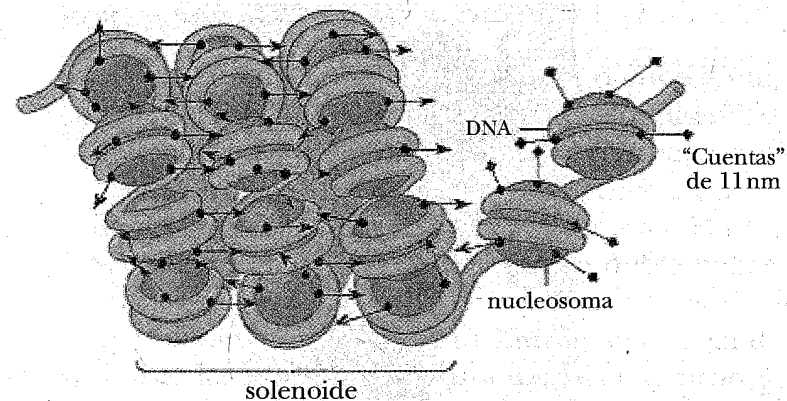


Figura 10. El rosario de DNA con las histonas se vuelve a enrollar para dar lugar a la cromatina.

(figura 10), este enrollamiento es semejante a un hilo de los teléfonos antiguos y el resultado es una compactación por un factor de seis en el tamaño del DNA de un organismo.

En ciertos momentos de la vida de los organismos eucariontes existen todavía dos fases más de arreglos espaciales de la molécula. En el primero de ellos, la cromatina, que vista desde lejos puede considerarse como un hilo aunque ya sabemos que está formada por una sucesión de nucleosomas, que a su vez son enrollamientos de la doble hélice alrededor de las histonas, se enrolla alrededor de un eje imaginario longitudinal para formar las rosetas de DNA (*supercoiling*) y dar lugar a un hilo de mayor calibre. Por último, este hilo se acomoda para dar lugar a los cromosomas (figura 11). En la figura 12 se muestra una ilustración con el sumario de la organización espacial del DNA a todas las escalas.

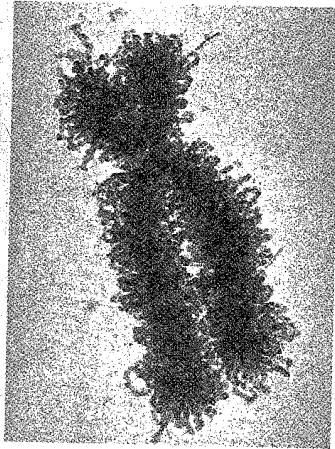


Figura 11. Fotografía de microscopio electrónico del cromosoma 12 del *H. sapiens*.

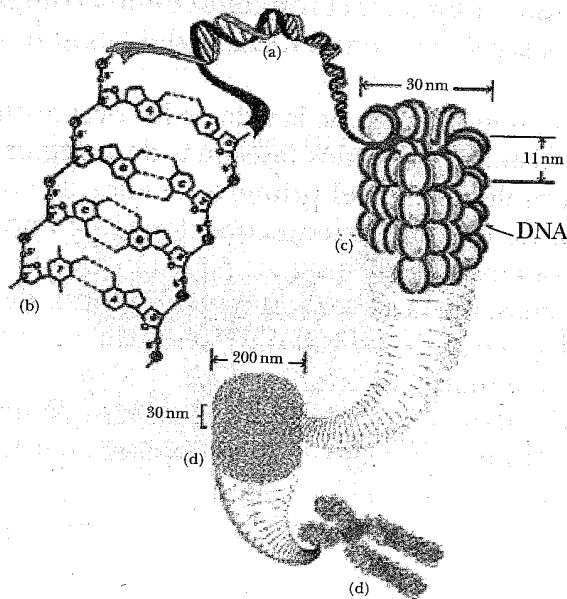


Figura 12. Representación gráfica de las estructuras tridimensionales del DNA desde la escala de las bases nitrogenadas hasta los cromosomas.

#### 4. REPLICACIÓN DEL DNA

Cada vez que una célula, procarionte o eucarionte, se divide para dar lugar a dos células hijas, se requiere necesariamente que el DNA se duplique para que cada una de éstas tenga una copia de la molécula. El proceso que lleva a la duplicación del DNA se llama *replicación*. Para que el DNA se replique, es necesario que la doble hélice se “desenrolle” y “aplane” y se abra como un *zipper* descompuesto, rompiendo los enlaces de hidrógeno y dejando al descubierto las bases. La apertura del DNA se propaga a lo largo de la cadena y las partes expuestas sirven de molde para la síntesis de la cadena complementaria y así se obtiene un duplicado exacto de la molécula original (figura 13).

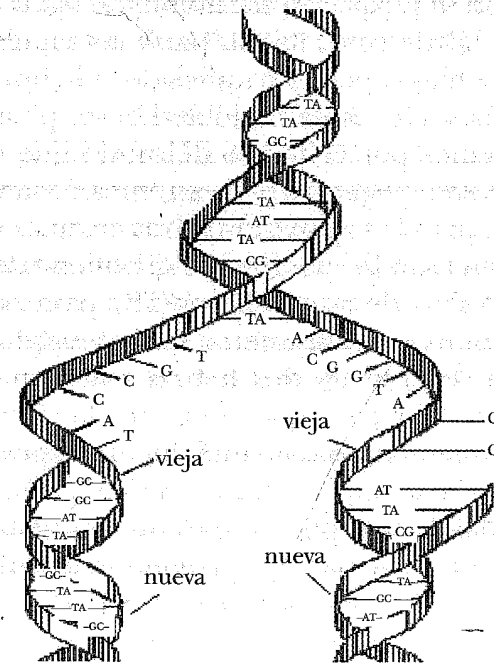


Figura 13. Replicación del DNA (ver el texto).

Para que la replicación se lleve a cabo en los organismos procariontes, es necesario que la intrincada estructura espacial del DNA se relaje, es decir, que el DNA se destuerza y, en el caso de los eucariontes, se libere del nucleosoma. Para realizar estas acciones se requiere el concurso de unas enzimas accesorias llamadas *topoisomerasas*. La topoisomerasa de tipo I resuelve el problema de la tensión que causa el tratar de desenrollar el DNA. Cuando el hilo del teléfono se desenreda, es necesario permitir que gire hasta que la tensión se libera. Éste es el rol de las topoisomerasas de tipo I que son proteínas que se adhieren al DNA y cortan una de las dos cadenas de la doble hélice y, mientras mantienen fija la cadena que no fue cortada, permiten el giro de la complementaria hasta que la tensión se relaja y en ese momento ligan (o pegan) de nuevo el borde roto. Por su parte las topoisomerasas del tipo II deshacen posibles nudos de la hebra del DNA; cortan las dos cadenas de la doble hélice, pasan uno de los dos extremos por el centro del nudo que van a deshacer y vuelven a pegar los dos extremos. Una vez preparado el DNA para la replicación, otras enzimas conocidas como *helicadas* usan la energía que se obtiene de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP) para romper los puentes de hidrógeno se unen a las bases del DNA y de esta manera separan las dos hebras complementarias y dejan listo al DNA para que comience la síntesis de las cadenas complementarias, lo que finaliza el proceso de la replicación.

El paso final de la replicación es precisamente la síntesis de las nuevas cadenas complementarias y es mediado por las enzimas llamadas *polimerasas* del DNA. Estas proteínas "leen" la sucesión de bases en las cadenas abiertas y sintetizan la complementaria. Como resultado de ello las dos nuevas cadenas de DNA, tendrán una hebra de la

cadena original y una hebra nueva; es por eso que la replicación del DNA es un proceso *semiconservativo*.

El inicio de la replicación se da en un sitio de origen o *replicón*; en el caso de los procariontes existe un sitio de origen ya que el genoma es circular, a diferencia de los eucariontes que suelen tener varios replicones o sitios de origen. La polimerasa de DNA,<sup>2</sup> enzima que sintetiza las nuevas hebras de DNA (molde-dependiente), trabaja siempre en un solo sentido al leer la cadena molde, por lo que la nueva hebra sintetizada siempre crece en el sentido 5' a 3', lo que genera que una de las hebras molde sea leída de manera discontinua ya que es contraria a la dirección en que se mueve la polimerasa (a esta hebra se le llama también hebra retardada) por lo que ésta sintetiza el nuevo DNA en pequeños pedazos que son conocidos como fragmentos de Okazaki (figura 14). Para esto es necesario que se abra la horquilla de replicación para empezar a replicarse desde los iniciadores de RNA (*primers*), donde la polimerasa III del DNA, sintetiza dichos fragmentos hasta encontrar el siguiente iniciador de RNA del siguiente fragmento. Posteriormente la polimerasa II de DNA remueve los RNA y coloca DNA en los huecos del *primer*, para que en seguida una enzima (la ligasa de tipo I) se encargue de unir los fragmentos generados, terminando así con dos nuevas hebras de DNA idénticas a la primera.

Sin embargo, es posible que se generen errores en el proceso de replicación, es decir que cambie la información de la cadena original, lo que provoca el surgimiento de mutaciones (cambios de bases, inserciones, pérdidas

<sup>2</sup> A diferencia de las polimerasas de RNA que se encuentran conservadas y son homólogas (tienen un origen común) en procariontes y eucariontes, las de DNA son más diversas entre los dominios celulares y sólo existe evidencia de homología en el dominio *palm* de dichas proteínas.

o duplicaciones) que modifican el DNA de generación en generación, aunque es importante mencionar que la acumulación o fijación de dichas mutaciones depende también de otros procesos. Lo cierto es que si la replicación fuera perfecta la variación genética en las poblaciones sería nula y, por ende, no habría posibilidades de evolución.

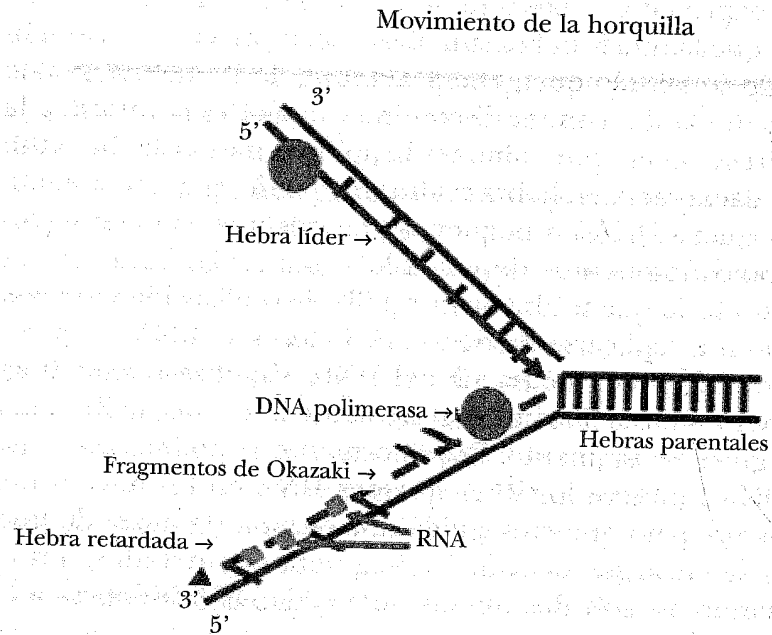


Figura 14. En el esquema se muestra el proceso de polimerización de las hebras nuevas de DNA, cuando lee la hebra 3'-5' la polimerasa sintetiza de manera continua en la dirección 5' a 3', en la hebra contraria (5'-3') la síntesis se realiza en segmentos (fragmentos de Okazaki), ya que la polimerasa II sólo puede leer en el sentido contrario (3'-5').

## 5. TRANSCRIPCIÓN

La *transcripción* es el último proceso en el que el DNA participa; es en ella donde la información contenida en el DNA pasa al RNA (ver el capítulo dedicado al RNA en este mismo libro), para que luego se inicie la síntesis de proteínas. La transcripción es una de las etapas más importantes en el desarrollo de una célula o un organismo ya que no sólo se define a cuáles genes será transferida la información, sino también su frecuencia, es decir la *regulación génica*. Por ejemplo, en términos de composición génica, el genoma del chimpancé es sumamente parecido al del *H. sapiens* pero la diferencia de expresión es lo que los separa fenotípicamente de los humanos. Lo mismo ocurre con nuestras células, donde la expresión diferencial dictamina si éstas serán células de hígado, piel o del sistema nervioso central, ya que cada una de ellas posee la información genética para ser casi de cualquier tipo. Sin embargo, esta regulación garantiza la especialización de cada una en su lugar y función adecuados.

La transcripción inicia con la lectura del DNA por medio de una polimerasa de RNA que sintetiza el RNA mensajero; en procariontes existe una sola y tres diferentes en eucariontes, pero es la polimerasa II la que transcribe la mayoría de los genes que codifican proteínas.<sup>3</sup> Sin embargo, el inicio de este proceso no es tan sencillo, ya que se necesitan sitios promotores, regiones del DNA con una secuencia específica (como la caja TATA) que marcan un sitio de inicio donde otro grupo de proteínas, los *factores de transcripción* (TF), activan o reprimen la transcripción del gen. Dependiendo de estos factores la

<sup>3</sup> La polimerasa I de RNA transcribe los genes ribosomales (rRNA) 18S y 28S, mientras que la polimerasa III transcribe principalmente los genes de los RNAs de transferencia (tRNA).

RNA polimerasa iniciará o no su proceso de síntesis de RNA. Además de los antes mencionados, existen otras regiones dentro del DNA que modulan a los promotores, conocidos por su nombre en inglés como *enhancer*, que aumentan o estimulan y los *silencers* que disminuyen o silencian la transcripción de un gen. Al tener la “maquinaria” o “complejo” completo, ya con sus proteínas (polimerasa, TFs) y promotores (en eucariontes pueden ser hasta cinco elementos, TFD, TBP, TFIIA, TFIIB, la polimerasa de RNA y ATP como fuente de energía). La RNA polimerasa inicia la transcripción al unirse al DNA y acceder a la hebra molde, comenzando a unir ribonucleótidos por medio de un enlace fosfodiéster, leyendo la hebra molde y creciendo la cadena sintetizada.<sup>4</sup> Desde el momento del inicio, muchos de estos factores son liberados y se desintegra el complejo de transcripción y la hebra nascente de RNA se ensambla hasta que la polimerasa encuentra un sitio de término.

La terminación del proceso de elongación de la hebra sintetizada tampoco es tan sencilla como se pudiera suponer, ya que ésta suele acompañarse de sitios en DNA con secuencias ricas en guanina (G) y citosina (C) y, finalmente, timina (T) formando secuencias palindrómicas para que el RNA recién formado se separe del molde de DNA. Además, en procariontes el mRNA es policistrónico, es decir que posee la información de varios genes en un solo segmento, asimismo el mRNA es traducido en el lugar donde es transcrito (mismo compartimiento) y su vida media es muy corta (del orden de segundos), a diferencia del mRNA eucarionte que es monocistrónico (cada segmento codifica sólo para un gen) y es sintetizado en el núcleo para luego ser traducido en el citoplasma, por lo cual no puede tener una vida media tan corta y en la

<sup>4</sup> En el RNA la base timina (T) es sustituida por uracilo (U).

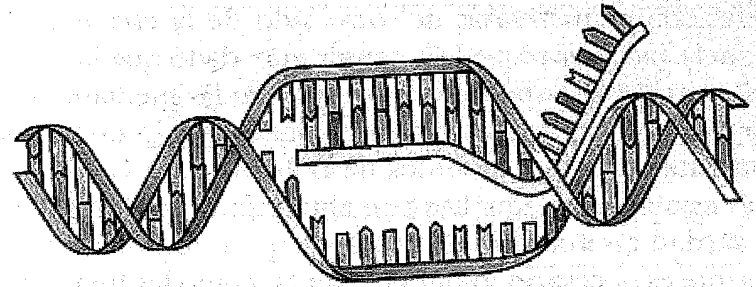


Figura 15. Imagen figurativa del proceso de transcripción.

región 3' se anexa una cadena de poli(A) que le confiere una mayor estabilidad, aumentando su vida media al rango de unas pocas horas. Adicionalmente y antes de salir al citoplasma el mRNA debe ser editado, es decir se deben cortar y sustraer la regiones no codificantes (intrones) y unir las partes codificantes (exones), todo esto por medio de ribonucleoproteínas. Este proceso de “maduración” también es conocido como *splicing*.

## 6. TERMODINÁMICA LOCAL DEL DNA

Como se ha visto en las secciones anteriores, en muchos pasos de la dinámica celular que involucran al DNA es necesario que la doble hélice se abra mediante la ayuda de enzimas para permitir la replicación o la transcripción. La desnaturalización del DNA es un proceso que requiere gasto de energía y es un hecho bien establecido que, bajo condiciones ambientales dadas, la estabilidad del dúplex depende de su secuencia primaria. Más específicamente, depende de la estructura de pares de bases a lo largo de uno de los pasamanos del polímero o, si se quiere, de una pareja de letras (“dímero”) junto con sus

bases complementarias del otro lado de la escalera. De manera intuitiva se podría pensar que, dado que las parejas complementarias de C y G están unidas mediante tres puentes de hidrógeno, mientras que A y T lo están únicamente con dos segmentos de DNA ricos en C y G, son más estables que aquellos con abundancia de A y T. Esto es verdad en una primera instancia pero hay otros factores que es necesario tomar en cuenta, como las fuerzas de Van der Waals que se originan de la interacción diagonal de las bases de un lado del pasamanos con sus contrapartes del complemento.

Si se piensa en la gran cantidad de técnicas de laboratorio que dependen de una estimación realista de la energía necesaria para desnaturalizar el dúplex, se entiende el que una buena cantidad de investigadores hayan tratado de encontrar, tanto de manera teórica como experimental, los parámetros termodinámicos locales del DNA. A la fecha no existe un acuerdo generalizado sobre el valor numérico preciso que tiene la energía libre necesaria para desnaturalizar una secuencia dada de DNA.

Uno de los primeros conjuntos de valores reportados fue publicado en 1986 por Kenneth Breslauer y su equipo y a partir de entonces varios grupos de investigadores han hecho su aportación. En 1998 Santalucía hizo una revisión de los conjuntos de valores que se han publicado y contribuyó con los propios pero la discrepancia continúa (tabla 2).

Por otra parte, en nuestro país L. Dadgdug ha desarrollado un modelo teórico para predecir las temperaturas de desnaturalización del DNA, mientras que P. Miramontes y G. Cocho han propuesto un método al usar información *in vivo* para discriminar entre los diversos conjuntos de parámetros termodinámicos propuestos por los diversos equipos, a partir de trabajos experimentales.

Tabla 2

COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LA ENERGÍA LIBRE POR DÍMERO DEL DNA REPORTADOS POR DIFERENTES AUTORES\*

Secuencia	Parámetro (kcal/mol)									
	Gotoh (ref. 7)	Vologodskii (ref. 10)	Breslauer (ref. 12)	Blake (ref. 17)	Benight (ref. 18)	Santalucía (ref. 20)	Sugimoto (ref. 21)	Unificados (ref. 22)		
AA/TT	-0.43	-0.89	(-1.66)	-0.67	-0.93	-1.02	-1.20	-1.00		
AT/TA	-0.27	-0.81	-1.19	-0.62	-0.83	-0.73	-0.90	-0.88		
TA/AT	-0.22	-0.76	-0.76	-0.70	-0.70	-0.60	-0.90	-0.58		
CA/GT	-0.97	-1.37	-1.80	-1.19	-1.26	-1.38	-1.70	-1.45		
GT/CA	-0.98	-1.35	-1.13	-1.28	-1.52	-1.43	-1.50	-1.44		
CT/GA	-0.83	-1.16	-1.35	-1.17	-1.03	-1.16	-1.50	-1.28		
GA/CT	-0.93	-1.25	-1.41	-1.12	-1.56	-1.46	-1.50	-1.30		
CG/GC	-1.70	-1.99	(-3.28)	-1.87	(-1.65)	-2.09	(-2.80)	-2.17		
GC/CG	-1.64	-1.96	(-2.82)	-1.85	-2.44	-2.28	-2.30	-2.24		
GG/CC	-1.22	-1.64	(-2.75)	-1.55	-1.67	-1.77	-2.10	-1.84		
Promedio	-0.92	-1.32	-1.82	-1.20	-1.36	-1.39	-1.64	-1.42		
Inicial w/term G-C	NA	NA	(+2.60)	NA	NA	0.91	(+1.70)	0.98		
Inicial w/term A-T	NA	NA	(+2.60)	NA	NA	1.11	(+1.70)	1.03		
Concentración de sodio, M	0.0195	0.195	1.0	0.075	0.115	1.0	1.0	1.0		
Rango de matriz	8	8	11	8	9	10	11	12		

\* Nótese la discrepancia en los valores numéricos.

## 7. DNA BASURA

En 1948, Roger y Colette Vendrely, bajo la dirección de André Boivin, se dieron a la tarea de medir el contenido de DNA en las células de distintos tejidos de algunas especies. Comenzaron con células de timo, hígado, páncreas y riñón de cerdo. El resultado de sus estudios reveló que la cantidad de DNA (el *C-value*) era constante sin importar el tipo de tejido de donde se tomara la muestra. La misma conclusión se obtuvo cuando el estudio se extendió a otras especie animales incluyendo mamíferos, peces y aves. Esta constancia en el tamaño del genoma en las células somáticas además del hecho de que los espermatozoides contenían la mitad del tamaño del genoma, llevó a los Vendrely a la deducción de que era el DNA el material del cual estaban hechos los genes. En los años siguientes, otros investigadores extendieron la hipótesis de la constancia del tamaño del genoma en las células de plantas e insectos y se dio por hecho que cada especie está plenamente caracterizada por un único contenido de DNA en cada una de sus células.

Sin embargo, este descubrimiento generó una paradoja pues la consideración de que cada organismo tuviese un tamaño de genoma específico implicaba, en primera instancia, que los genomas más grandes deberían tener mayor cantidad de genes que los pequeños y esto chocó contra la realidad. En efecto, como vimos arriba, el tamaño del genoma no correlaciona con la complejidad del organismo no importa qué definición de "complejidad" se use. Esta paradoja recibió el nombre de *enigma del C-value*, hasta que el descubrimiento del DNA no codificante a principios de los años setenta del siglo pasado, la resolvió. Ahora, es claro que no todo el DNA se transcribe y eventualmente se traduce en aminoácidos y que, de

hecho, en muchos organismos la mayoría del DNA no tiene ese papel. La mayoría del genoma eucarionte no codifica para proteínas. El porcentaje varía mucho filogenéticamente, pero en el caso del *Homo sapiens* únicamente el 1.5% contiene información que a la larga dará lugar a una proteína. La función del resto del DNA es, en su mayoría desconocida, lo cual no quiere decir que no exista.

## 8. EL DNA COMO DOCUMENTO HISTÓRICO

El contar con la secuencia completa del DNA de varios organismos (más de 900 genomas disponibles al momento de escribir este párrafo) ha permitido que la biología molecular se haya convertido en uno de los campos más prometedores de la investigación científica, ya que su vertiginoso desarrollo ha permitido no sólo describir procesos celulares inéditos, sino también ha provocado verdaderas revoluciones conceptuales dentro de las ciencias naturales. Sin duda alguna la biología evolutiva ha sido una de las áreas más beneficiadas ya que se han implementado nuevas herramientas que permiten escudriñar en lo más íntimo las relaciones filogenéticas, generando hipótesis que hubieran sido imposibles con otros métodos.

"...Cuando no se dispone de evidencia paleontológica, la relación filogenética entre los animales puede ser deducida basándose en la similitud de las estructuras de las formas actuales..."

La frase anterior fue escrita por George H. Nutall en 1904, en un libro donde se resumían los resultados obtenidos de la comparación de sueros sanguíneos entre diferentes animales, con la intención de reconstruir las



relaciones evolutivas que dichos organismos guardaban entre sí, siendo éste el primer intento de usar rasgos moleculares como marcadores filogenéticos. Sin embargo, no fue sino hasta 1965 cuando Emile Zuckerkandl y Linus Pauling publicaron un trabajo en donde mostraban que la comparación de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos, específicamente DNA, permitía no sólo la construcción de filogenias moleculares sino también en algunos casos, fechar los procesos de especiación incluso cuando se carece de información paleontológica. Durante cerca de diez años este enfoque permitió no solamente comparar proteínas como las hemoglobinas, el citocromo C, las ferredoxinas y otras más, sino también construir árboles evolutivos que podían incluir organismos tan distintos entre sí como las bacterias y los hongos, lo cual hubiera sido imposible con los criterios morfológicos tradicionales.

Sin embargo, estos cambios han abierto nuevos debates, sobre todo en la apreciación del alcance y los límites de las metodologías moleculares. Algunos ejemplos de esta controversia se dan en la caracterización de las primeras células, el origen de los diferentes componentes de la célula eucarionte y en la validez de los sistemas taxonómicos tradicionales. Es claro que el desarrollo pleno del potencial de las filogenias moleculares dependerá no sólo de refinamientos metodológicos que permitan mejorar los algoritmos que se usan para reconstruir la historia evolutiva con datos moleculares, sino también del análisis crítico de su armazón teórico, que incluye varios conceptos centrales adoptados directamente por la biología molecular de la teoría clásica evolutiva.

El reconocimiento de que el DNA es un documento histórico del cual se puede extraer información evolutiva ha incrementado el margen de estudios filogenéticos a

muy alto nivel. El desarrollo de las técnicas de análisis de los ácidos nucleicos, que ha permitido la secuenciación de genomas completos, combinado con el rápido desarrollo de la informática, han llevado no sólo a un crecimiento explosivo de información en los bancos de datos y nuevas herramientas sofisticadas para su análisis, sino también al reconocimiento de que el DNA puede funcionar como cronómetro molecular en la reconstrucción de filogenias universales.

El trabajo más destacado de este tipo, ha sido la comparación evolutiva de las subunidades pequeñas del RNA ribosomal (rRNA), que permitió la construcción de un

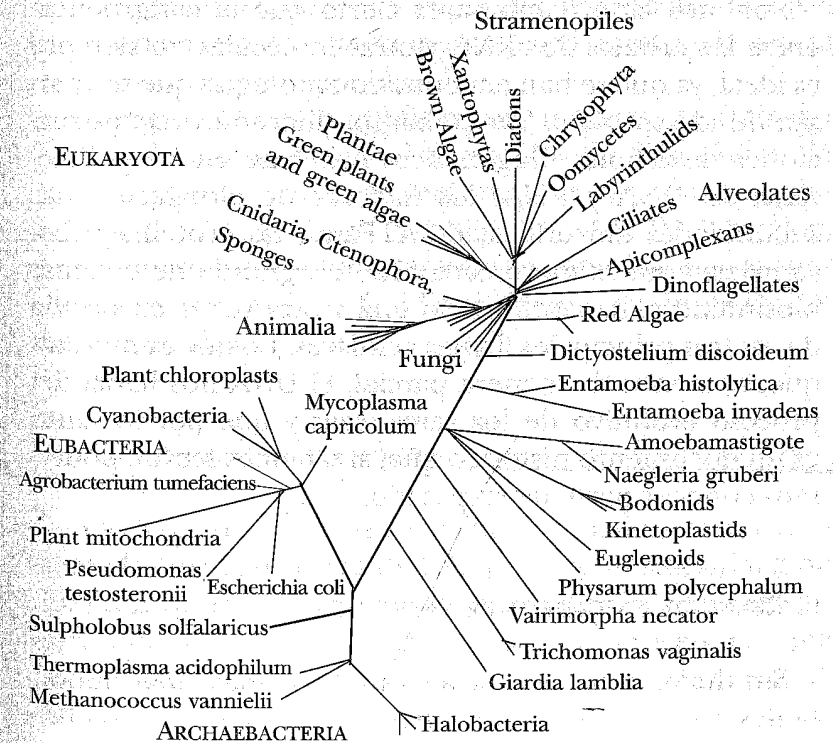


Figura 16. Árbol filogenético que muestra los tres dominios conocidos: Eukaryota, Eubacteria y Archaeobacteria.

árbol en el que todos los organismos conocidos quedaron agrupados en uno de los tres linajes celulares: las *Bacteria*, las *Archaea* y los *Eucarya*. Aunque el análisis se puede criticar por su carácter reduccionista, es evidente que la identificación de estos tres linajes no es una ilusión provocada por el uso de una sola molécula como marcador evolutivo (figura 16). Por ejemplo, en 1999 tres grupos de trabajo demostraron en forma independiente que la representación gráfica del contenido total de secuencias en los genomas completos secuenciados muestra cómo los tres dominios y las distintas líneas biológicas que las constituyen se pueden identificar sin problemas.

Por otro lado, también es cierto que la congruencia entre los árboles de rRNA y otras moléculas no siempre es ideal, ya que se han encontrado topologías que se apartan de lo esperado. Sin embargo, diferentes reconstrucciones de árboles filogenéticos con base en las polimerasas de DNA y RNA, los factores de elongación, las subunidades hidrofílicas de ATPasas, las proteínas ribosomales, y un número cada vez más grande de enzimas biosintéticas, ha confirmado una y otra vez la existencia de los tres principales linajes celulares. Lo que demuestra que, al menos de manera parcial, el DNA nos habla del proceso evolutivo de los seres vivos y que por lo tanto es un documento histórico que, si sabemos leerlo, podremos conocer parte de su pasado.

#### 9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Sin duda, uno de los avances tecnológicos más importantes de las tres décadas pasadas ha sido el descubrimiento por Kary Mullis de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), por el que obtuvo el premio Nobel en

1983. La PCR permite la multiplicación de fragmentos de DNA, de manera que de un original se pueden obtener millones de copias. Una PCR comienza por desnaturalizar el DNA por medio de calor, la muestra se calienta durante varios minutos hasta que el dúplex se separa en hebras sencillas. A continuación se disminuye la temperatura y se permite que los segmentos complementarios a la región que se desea amplificar (*primers*) se peguen a las hebras. Después se deja que la polimerasa *Taq* sintetice una nueva hebra de DNA a partir de los *primers* y se vuelve a elevar la temperatura para desnaturalizar de nuevo la doble cadena y el ciclo se repite tantas veces como se quiera, obteniéndose una copia del fragmento de DNA deseado en cada vuelta, de modo que el número de copias crece de manera exponencial.

La capacidad de amplificar una muestra de DNA ha permitido que se desarrollen técnicas de diagnóstico de enfermedades y, como se verá más adelante, también ha permitido el auge de las investigaciones de DNA arcaico, lo mismo que el uso del DNA para propósitos de reconocimiento parental o de identificación en investigaciones criminales.

#### 10. HUELLA O FIRMA GENÓMICA

A lo largo de la historia de la humanidad ha estado presente la cuestión acerca de la certeza de la paternidad de los individuos. Durante siglos, para un niño adoptado en busca de sus padres biológicos, para un individuo al que se le reclamaba la paternidad de un infante o para familias separadas por eventos imponderables, la única manera de intentar reconocer la paternidad se basaba en rasgos fenotípicos, como el color de los ojos, la estatura, el

color del cabello. Ahora sabemos que estos rasgos no bastan para determinar la paternidad pues, por ejemplo, el color de los ojos no está determinado por un solo gen y las posibles combinaciones alélicas de una generación a la siguiente pueden generar individuos con color de ojos muy distinto que el de los padres biológicos (salvo en el caso de poblaciones pequeñas y cerradas).

A principios del siglo pasado, se logró la identificación de cuatro diferentes tipos de sangre en los humanos (los ahora familiares tipos A, AB, B y O). Estos tipos (o grupos) sanguíneos están determinados genéticamente y se conocen las reglas mediante las cuales se heredan de padres a hijos. Es decir, si se conocen los tipos sanguíneos de los padres se puede saber el tipo del infante, pero el problema es que la relación no es siempre unívoca. Por ejemplo, si ambos padres tienen el tipo O, entonces el hijo tendrá el tipo O pero, si en cambio la madre es O y el padre A, el hijo puede ser tanto O como A. Finalmente, un caso extremo lo representan el caso de una madre A con un padre B pues entonces el hijo puede tener cualquiera de los cuatro grupos. La operación inversa; conocido el tipo sanguíneo del hijo determinar el de los padres, es aún más complicado pues un niño de tipo O puede ser el resultado, ni más ni menos, de nueve de las dieciséis posibles combinaciones parentales. Aunque el descubrimiento de los grupos sanguíneos representó un gran avance en el problema de la determinación de la paternidad, no es un criterio en el cual se pueda fundamentar con certeza ese rasgo.

A lo largo del siglo pasado se ensayaron otros criterios para la determinación de la paternidad (tales como ciertos estudios serológicos y de antígenos) pero todas estos métodos tenían, o bien dificultades técnicas que los hacían

poco prácticos, o grados de certidumbre demasiado bajos para considerarse una verdadera solución del problema.

Cuando hablamos del genoma de una especie (o del genoma humano en particular) se tiende a pensar que todos los integrantes de la especie en cuestión poseen una copia idéntica, base por base de la misma secuencia de DNA. En el caso de los humanos esto no es completamente cierto; si bien más del noventa y nueve por ciento del genoma es el mismo entre los individuos, el resto tiene suficiente variabilidad como para permitir la distinción de un individuo a otro. El hecho de que cada individuo posea un genoma único permite definir una huella genómica que, análogamente a las huellas digitales, permita la identificación de un individuo. Esto ha demostrado ser particularmente útil en el caso de las investigaciones criminales pues una muestra orgánica (cabello, semen, sangre) encontrada en la escena de un crimen puede ser una prueba incriminatoria contra un sospechoso. En las regiones de DNA que no son transcritas y que por lo tanto no contienen la información conducente a la síntesis de proteínas, se encuentra la especificidad individual. En esas regiones intergénicas a menudo se encuentran repeticiones de patrones conocidos como VNTR (siglas del inglés *Variable Number Tandem Repeats*). Es precisamente el número de VNTR lo que varía de individuo a individuo y es el criterio que se emplea para definir una huella génica. Para esto, se corta el segmento de DNA que contiene la secuencia repetida usando enzimas de restricción, se amplifica usando la PCR y con la técnica de electroforesis en gel se determina el tamaño (número de repeticiones) de ese fragmento. Si se analizan varios sitios de DNA y se reúnen los resultados es fehacientemente posible establecer la pertenencia de una muestra de DNA a un individuo.

## 11. DNA FÓSIL

Como ya se mencionó más arriba, la comparación de secuencias de DNA de genomas de diferentes especies ha sido una fuente muy importante del conocimiento que se tiene hasta la fecha del cambio evolutivo a nivel molecular. Desde que se cuenta con la herramienta de la reacción de polimerasa en cadena, se han abierto campos de investigación que antes se pensaban imposibles. Uno de ellos es la recuperación de DNA arcaico, perteneciente a especies que ya se encuentran extintas. A pesar de que la molécula del DNA es relativamente inestable y se degrada con rapidez cuando el organismo muere, puede conservarse por tiempos largos bajo condiciones especiales. Aunque algunos equipos de trabajo, entre los que destacan el de Russ Higuchi en Berkeley y el de Svante Pääbo en Leipzig habían recuperado, en el primer caso, fragmentos de DNA de una cebra extinta con ciento cincuenta años de haber muerto y, en el segundo, de restos humanos momificados con varios miles de años de antigüedad, lo cierto es que el primer genoma completo de un organismo desaparecido es el de un mamut encontrado en el *permafrost* de Siberia. La edad de la muestra es de aproximadamente veinte mil años. Hay equipos de trabajo intentando completar el genoma del desaparecido demonio de Tasmania y del hombre de Neanderthal.

Al tiempo de escribir estas líneas, se ha publicado el reporte de la presentación del primer borrador del genoma completo del *Homo neanderthalensis* por parte del ya mencionado equipo de Svante Pääbo. Los proyectos más ambiciosos pretenden recuperar el DNA de organismos, principalmente insectos, atrapados en piedras de ámbar que datan de unos cuarenta millones de años.

## 12. CÓMPUTO CON DNA

La propiedad de cómputo, entendido como la capacidad de implementar y llevar a cabo un algoritmo, no depende en principio de la base material de la máquina que la tiene. Independientemente de consideraciones relacionadas con la velocidad o capacidad de almacenamiento, una computadora podría estar construida sobre la base de cualquier dispositivo que pueda conmutar entre varios estados.

El campo de la computación no convencional es una rama de la ciencia moderna que estudia la posibilidad de explotar la computabilidad de sistemas ópticos, cuánticos, mecánicos y moleculares. En este último rubro cabe destacar la propuesta publicada en 1995 por Leonard Adleman de construir máquinas computadoras basadas en DNA.

Utilizando exclusivamente la propiedad de que el DNA consta de dos hebras complementarias y empleando técnicas de laboratorio bien establecidas como la electroforesis en gel, el uso de enzimas de restricción y ligasas y la reacción de la polimerasa en cadena, Adleman fue capaz de resolver un problema matemático perteneciente a la clase NP-completa (sin entrar en detalles sólo diremos que se trata de aquellos problemas para los cuales, si se conoce un candidato a solución, se puede verificar rápidamente si lo es o no; pero es prácticamente imposible dar un algoritmo constructivo para llegar a las soluciones). El problema elegido por Adleman pertenece a la teoría de gráficas y es la búsqueda de las rutas hamiltonianas de una gráfica no dirigida. Dada una gráfica (un conjunto de nodos y de aristas que los unen) una ruta hamiltoniana se puede definir como aquella que comienza en un nodo dado, termina en el mismo y visita todos

los nodos una sola vez. Se ha demostrado que éste es un problema NP-completo. Empleando la parafernalia mencionada de técnicas experimentales del DNA, Adleman resolvió el problema para una gráfica de cinco nodos (evidentemente, cinco nodos representan un problema muy pequeño) pero enfatizó el interés en la manera de resolverlo. De manera esencial la aportación de Adleman fue, mediante el uso de DNA, implementar una enorme cantidad de procesadores muy elementales pero que, actuando con un paralelismo masivo, fueron capaces de resolver un problema complicado.

Si bien en un futuro inmediato no se vislumbra la existencia de computadoras de DNA comerciales, desde 1995 este campo ha avanzado de manera notable gracias a los avances, tanto teóricos, como en el mejoramiento de las técnicas de laboratorio para manipulación de DNA.

## REFERENCIAS

### Sección 1

1. Gregory T. R., Nicoll J. A., Tamm H., Kullman B., Kullman K., Leitch I. J., Murray B. G., Kapraun D. F., Greilhuber J., y Bennett M. D., *Eukaryotic genome size databases*, *Nucleic Acids Research* **35**, 332-338. (2007).

### Sección 2

3. Dahm R., *Friederich Mieschner and the discovery of DNA*, *Developmental Biology* **278**, 274-288 (2005).
4. Maddox B., *Rosalind Franklin: The dark lady of DNA*, Harper Collins (2002).
5. Olby R. C., *The path to the double helix: The discovery of DNA*, Courier Dover Publications (1994).
6. Watson J. D., *The double helix: A personal account of the discovery of the structure of DNA*, Simon & Schuster (2001).
7. Watson J. D. y Crick F. H. C., *Molecular Structure of Nucleic Acids*, *Nature* **171**, 737-738 (1953).

### Sección 3

8. Bates A. D. y Maxwell A., *DNA topology*, Oxford University Press (2005).
9. Kornberg R. D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*, *Science* **184**, 868-871 (1974).
10. Sinden R. R., *DNA structure and function*, Academic Press (1994).

### Sección 4

11. Lewin B., *Genes IX*, Jones & Bartlett (2006).
12. Jiménez L. y Merchand H., *Biología celular y molecular*, Pearson Education (2003).

### Sección 5

13. Lewin B., *Genes IX*, Jones & Bartlett (2006).
14. Jiménez, L. y Merchand, H., *Biología celular y molecular*, Pearson Education (2003).

### Sección 6

15. Breslauer K., Franks R., Blockers H. y Markyt L. A., *Predicting DNA duplex stability from the base sequence*, *PNAS* **83**, 3746-3750 (1986).
16. Dagdug L., *Theoretical basis for the Marmur-Doty relation*, *AIP Conf. Proc.*, vol. 978, 57-64 (2008).
17. Miramontes P. y Cocho G., *DNA dimer correlations reflect in vivo conditions and discriminate among nearest-neighbor base pair free energy parameter measures*, *Physica A* **312**, 577-586 (2003).
18. SantaLucía J., *An unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics*, *PNAS* **95**, 1460-1465 (1998).

### Sección 7

19. Leuchtenberger C., Vendrely R. y Vendrely C., *A Comparison of the content of desoxyribonucleic acid (DNA) in isolated animal nuclei by cytochemical and chemical methods*, *PNAS* **37**, 33-38 (1951).

### Sección 8

19. Becerra-Bracho A., Silva E., Velasco, A. M. y Lazcano A., *Molecular Biology and the reconstruction of Microbial Phylogenies*. En *Astrobiology: Origins from the Big-Bang to civilization*, J. Chela-Flores, G. Lemerchand y J. Oro (editores), Kluwer Academic Publishers (2000).

Sección 9

21. Mullis, K., *The unusual origin of the polymerase chain reaction*, Scientific American, abril 1990, 56-65 (1990).

Sección 10

22. Kobilinsky L. F., Liotti T. F., Oeser-Sweat J. y Watson J. D., DNA: Forensic and legal applications, John Wiley and Sons (2004).  
Bonnett R., Robertson J., Ross A. M. y Burgoyne L. A., DNA in forensic science, Routledge (1990).

Sección 11

23. Pääbo S., *Ancient DNA*, Scientific American (noviembre, 1993).

Sección 12

24. Adleman L., *Computing with DNA*, Scientific American (agosto, 1998).

## CAPÍTULO 4 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL ARN

JUAN MIRANDA RÍOS \*

Unidad de Genética de la Nutrición  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

“Es algo inusual que un trabajo revolucione por completo nuestra manera de pensar acerca de los procesos biológicos y su regulación, pero esto ha abierto un nuevo campo en la biología”.

\*\* Nick Hastie

### I. INTRODUCCIÓN

Aún es difícil comprender la agitación que el ARN ha causado en la biología en los últimos años. Hasta hace algún tiempo se le consideró como un intermediario pasivo, el cual llevaba los mensajes genéticos de manera fiel desde la secuencia en el ADN hasta la maquinaria que fabrica a las proteínas. Esta visión de las funciones del ARN ha cambiado completamente. Por un lado, Thomas Cech y Sydney Altman descubrieron que el ARN es capaz de llevar a cabo reacciones enzimáticas y llamaron ribozimas a las moléculas de ARN que presentan actividad

\*\* Comentario acerca del descubrimiento de los ARNs silenciadores y los microARNs.

\* riosjuanm@hotmail.com

catalítica [1][2]. Este descubrimiento tan revolucionario les hizo merecedores del Premio Nobel de Química en el año 1989, ya que con anterioridad se pensaba que sólo las proteínas podían catalizar una reacción enzimática y además le dio sustento a la hipótesis del "mundo del ARN", formulada en los años 60's del siglo XX por Francis Crick y Leslie Orgel, en la cual se establecía que los primeros seres vivos podrían haber basado su existencia en el ARN, que presentaría capacidades tanto informacionales como catalíticas [3][4].

Por otro lado, recientemente se descubrió el fenómeno de interferencia de ARN, en el que, por medio del uso de pequeñas cadenas de esta molécula, es posible silenciar a voluntad la expresión de genes específicos. Este descubrimiento ayudó a su vez a reconocer que las células usan de manera natural moléculas de ARN de 20 a 22 nucleótidos de longitud, a los cuales se les conoce como microARNs (miARNs), que juegan un papel muy importante en la regulación genética [5][6]. Por este descubrimiento Andrew Fire y Craig C. Mello obtuvieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 2006.

Con el advenimiento de las poderosas técnicas genómicas ha sido posible la secuenciación y el análisis de una gran cantidad de genomas. Así, por ejemplo, se sabe que únicamente entre el 1 y 2% del genoma humano sirve como templado en la síntesis de proteínas. La paradoja es que en algunos tipos de células, hasta el 80% del genoma es copiado a ARNs [7]. ¿Por qué las células se habrían de molestar en sintetizar todo ese ARN si sólo una pequeña fracción está involucrada en servir de templado durante la síntesis de proteínas? Es indudable que el estudio del ARN nos depara muchas sorpresas en el futuro próximo.

## 2. ESTRUCTURA DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO

El ARN, al igual que el ADN, es un polímero formado por monómeros llamados nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, el cual está unido a una pentosa (un azúcar de cinco carbonos). A su vez, una base orgánica está unida al carbono 1 de la pentosa. Existen dos diferencias básicas entre los monómeros que forman al ADN y al ARN. En el caso del ADN, la pentosa que lo forma es la desoxirribosa, mientras que en el caso del ARN es la ribosa, la cual tiene un hidroxilo en el carbono 2, a diferencia de la desoxirribosa que tiene un hidrógeno en ese carbono (figura 1). Otra diferencia la encontramos en las bases nitrogenadas que los forman. En el ADN encontramos adenina, citosina, guanina y timina, mientras que en el ARN la timina es sustituida por el uracilo (ver figura 1). Mientras que la adenina (A) y la guanina (G) son purinas y están formadas por un par de anillos aromáticos fusionados; la citosina (C), la timina (T) y el uracilo (U) son pirimidinas, formadas por un solo anillo.

Los nucleótidos se unen uno al otro cuando el grupo hidroxilo del carbono 3' del azúcar de un nucleótido forma un enlace fosfodiéster con el grupo fosfato de otro nucleótido, eliminando una molécula de agua. Una hebra de ADN o ARN presenta un extremo 5' con un grupo hidroxilo libre o un grupo fosfato y un extremo 3' con un grupo hidroxilo libre en el carbono 3' de su azúcar terminal. La direccionalidad antes citada y el hecho de que su síntesis se lleve a cabo de 5' a 3' ha llevado a la convención de escribir las cadenas de ácidos nucleicos en la dirección 5' → 3'.

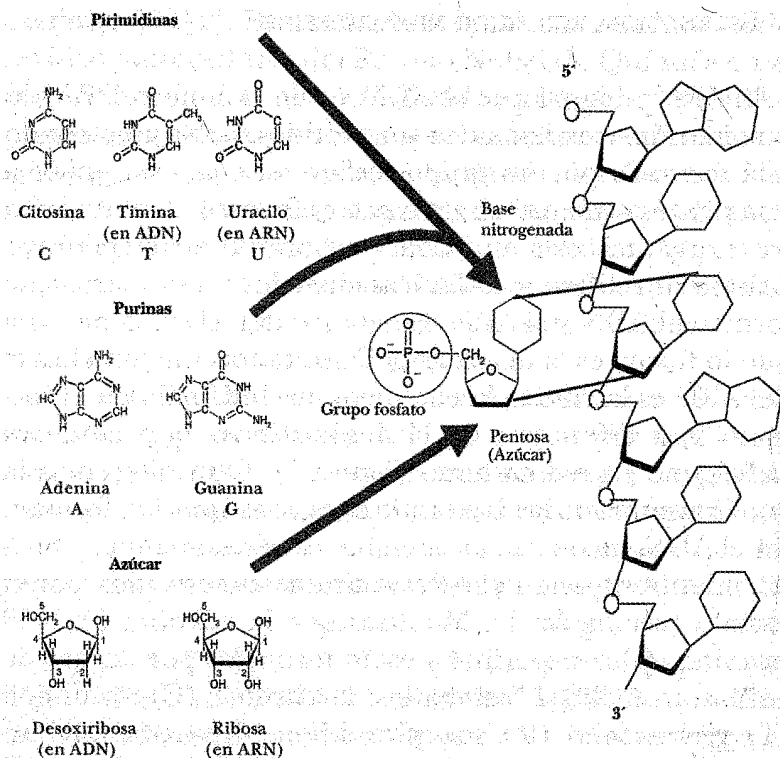


Figura 1. Componentes de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos son polímeros formados por nucleótidos, los que a su vez están compuestos de una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato. Los nucleótidos están unidos entre sí mediante enlaces fosfodiéster. En el ADN el azúcar presente es la desoxirribosa, mientras que en el ARN es la ribosa. Las bases presentes en el ADN son la guanina, la adenina, la citosina y la timina. En el ARN el uracilo está presente en lugar de la timina.

### 2.1. Estructura primaria

Las moléculas de ARN deben doblarse en el espacio para poder llevar a cabo sus funciones. La estructura del

ARN parece ser más modular que la estructura de las proteínas, formada por motivos estructurales comunes que producen formas tridimensionales similares. De manera análoga a las proteínas, se puede analizar el doblamiento del ARN en términos de estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura primaria del ácido ribonucleico está constituida por la secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster [8]. Aun cuando las estructuras primarias del ADN y el ARN son muy similares, sus conformaciones son muy diferentes. Generalmente al ARN se le encuentra como una cadena de una sola hebra, mientras que el ADN está formado por dos hebras entrelazadas y antiparalelas. Esta característica es fundamental para entender la diferencia en las funciones que cada tipo de molécula lleva a cabo en la célula.

### 2.2. Estructura secundaria

En el ADN, las dos hebras se entrelazan usando la regla de complementariedad siguiente: una purina se enlaza a una pirimidina: la A se une a la T y la C se une a la G, mediante la formación de dos y tres enlaces de hidrógeno, respectivamente. A este tipo de interacción entre las bases para formar la doble hélice se le llama la forma canónica o Watson-Crick, por los apellidos de los descubridores de dicha conformación.

En el caso del ARN, también puede formar regiones de doble hélice, pero la T es sustituida por el U, el cual puede formar un par de enlaces de hidrógeno con la A. Al igual que en el ADN, se observa complementariedad de bases entre la G y la C por medio de un triple enlace de hidrógeno. En el ARN la G puede aparearse con la U mediante un doble enlace de hidrógeno, como puede



verse en la figura 2. Además de la complementariedad de bases de la forma canónica, en el ARN se presentan las formas no canónicas, como las formas Hoogsteen reverso A·U y A·C, además de los apareamientos entre G·A, A·A, G·G, U·U y U·C (figura 2). En algunos ARNs se ha observado incluso que una base puede aparearse con otras dos o tres formando un triplex y un cuádruplex, respectivamente. La existencia de tan diversos modos de apareamiento encontrados en el ARN le da la capacidad de formar estructuras tridimensionales muy complejas.

Las moléculas de ARN generalmente están compuestas de varios dominios estructurales, los cuales pueden ensamblarse y doblarse de manera independiente en la forma de alguno de los siguientes motivos de estructura secundaria (figura 3):

- Hélices, que a diferencia de la doble hélice del ADN, presentan 11 pares de bases por vuelta.
- Estructuras de tallo y asa, en las que una hélice termina en una asa de nucleótidos de cadena sencilla.
- Asas internas, en las que algunos nucleótidos no forman parte de una hélice.
- Protuberancias, las cuales contienen nucleótidos en cadena sencilla en una de las cadenas, mientras que en la otra hebra se observa complementariedad de bases continua.
- Uniones, en las cuales dos, tres o más hélices están separadas entre sí por regiones de cadena sencilla.

Existen tres métodos para la deducción de la estructura secundaria de una molécula de ARN. El método filogenético o comparativo se basa en el hecho de que durante la evolución se ha preservado fundamentalmente la estructura funcional del ARN, más que su secuencia,

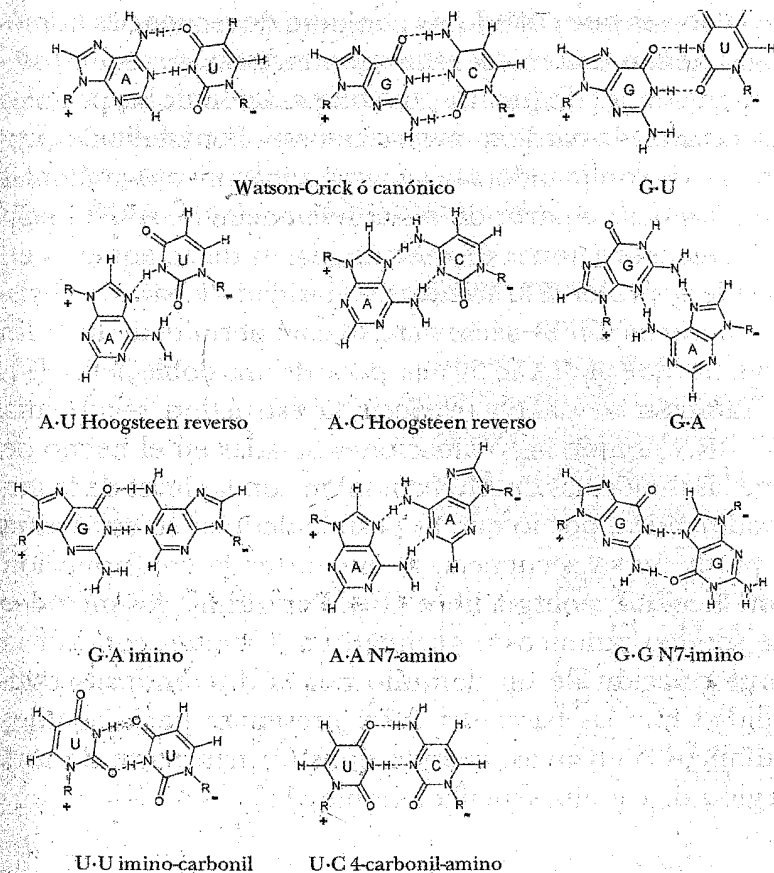


Figura 2. Complementariedad de bases mostrada por las moléculas de ARN.

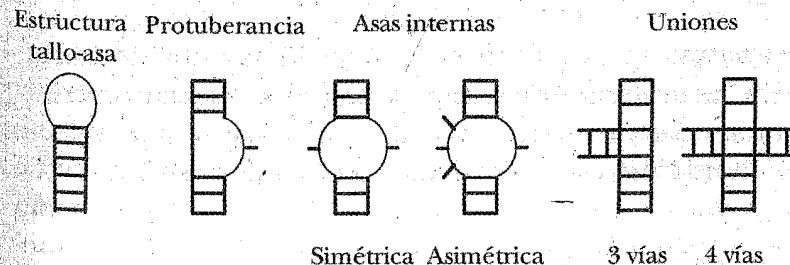


Figura 3. Estructuras secundarias presentes en los ARNs.

de tal forma que cuando un conjunto de secuencias homólogas tienen una cierta estructura en común, esta estructura puede ser deducida, por comparación de las posibles estructuras de sus diferentes secuencias. Por medio de programas de computadora se generan alineamientos múltiples de secuencia, a partir de varias secuencias de ARN; luego se detectan regiones de covariancia, es decir, aquellas en donde se preserva la complementariedad de bases sin existir conservación de secuencia, lo cual permite deducir las regiones que pudieran formar parte de una doble hélice [9].

También se puede predecir la estructura secundaria del ARN usando aproximaciones basadas en el hecho de que las moléculas de ARN cumplen con las leyes de la termodinámica, por lo que es posible deducir su estructura a partir de su secuencia, al encontrar la conformación con la menor energía libre [10]. Por último, los métodos de sondeo químicos o enzimáticos permiten conocer la conformación de un dominio por la diferente susceptibilidad que las bases del ARN presentan hacia agentes químicos o enzimas, cuando éstas forman parte de una región de cadena sencilla o doble [11].

### 2.3. Estructura terciaria

El siguiente nivel de organización corresponde a la estructura terciaria, en el cual los elementos de estructura secundaria antes mencionados se asocian entre sí por medio de fuerzas de van der Waals y por enlaces de hidrógeno específicos que involucran a estructuras de tallo y asa o protuberancias por medio de la formación de un pequeño número de apareamientos tipo Watson-Crick y/o apareamientos no canónicos (figura 4).

Así, la estructura terciaria del ARN comprende aquellas interacciones que involucran o bien dos hélices, o dos regiones de cadena sencilla o una región de cadena sencilla y una hélice. Las interacciones entre dos hélices son básicamente de dos tipos, en un caso dos hélices contiguas se apilan una sobre la otra o bien la interacción se da entre dos hélices distantes. Las interacciones entre cadenas sencillas pueden observarse entre las bases de las asas terminales o entre las bases presentes en una asa terminal y una protuberancia. Además, las interacciones entre dos regiones de cadena sencilla pueden producir la formación de pseudonodos si el ARN contiene al menos dos estructuras tallo-asa en las que la mitad de una asa está intercalada entre las dos mitades de otra asa.

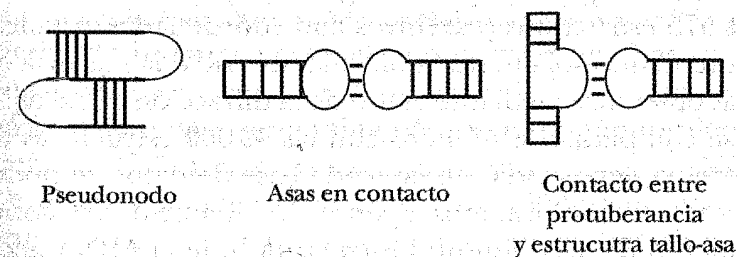


Figura 4. Estructuras terciarias encontradas en los ARNs.

### 2.4. Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria es la forma que resulta de la interacción entre más de una molécula de ARN o entre una o varias moléculas de ARN y otras moléculas como proteínas, que funcionan como parte de un complejo.

### 3. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL ARN

El conocimiento de la estructura terciaria de un ARN o de la estructura cuaternaria de los complejos de que forma parte, permite deducir cómo es que el ARN lleva a cabo su función.

Para determinar la estructura tridimensional de un ARN existen varios procedimientos biofísicos, como la difracción de rayos X, la resonancia magnética nuclear, y algunos métodos espectroscópicos como la espectroscopía en la región ultravioleta, la espectroscopía Raman y el dicroísmo circular [12]. En la base de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) se encuentran depositadas 575 estructuras o archivos con coordenadas atómicas conteniendo solamente moléculas de ARN, la mayoría de ellas obtenidas mediante el uso de la difracción de rayos X. Si se compara este número con las 40 000 estructuras de proteína depositadas en la citada base de datos, se podrá reconocer que estamos apenas en el inicio del conocimiento de las diferentes estructuras que el ARN puede adoptar en el espacio tridimensional.

### 4. LAS MOLÉCULAS DE ARN SE DOBLAN PARA DAR LUGAR A ESTRUCTURAS COMPACTAS, CAPACES DE REALIZAR RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y CATALISIS

Para que puedan llevar a cabo su función biológica, los ARNs deben doblarse sobre sí mismos y formar estructuras estables, un proceso que es influenciado por la presencia de iones, cofactores y proteínas, a través de varios mecanismos. Esta sensibilidad de la estructura del ARN a

la unión de ligandos se utiliza para regular la actividad de los mismos, lo que le da a estas moléculas una versatilidad inusitada.

#### 4.1. Interacciones entre iones metálicos y ARN

El doblamiento de las moléculas de ARN y por lo tanto, su función, dependen de su asociación con numerosos cationes, los cuales actúan para contrarrestar las cargas negativas del esqueleto de fosfatos y para organizar las estructuras terciarias por medio de sitios de unión específica. Las moléculas de ARN son polianiones de gran tamaño que contienen cargas negativas en el esqueleto de fosfatos, por la presencia de los grupos fosfodiéster que interactúan con iones cargados positivamente por medio de interacciones del tipo carga-carga. Las cargas negativas atraen a un gran número de iones con carga positiva, los cuales generalmente son iones monovalentes como el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{K}^+$  o iones divalentes como el  $\text{Mg}^{2+}$ . Estos iones pueden estar asociados débilmente con los grupos fosfodiéster principalmente por medio de interacciones electrostáticas, formando una "nube iónica"; también pueden formar interacciones específicas ya sea con el esqueleto del ARN o con las bases del mismo para unirse en posiciones únicas. Los sitios específicos de unión pueden incluir una interacción directa entre el ión positivo y el ARN o pueden darse por medio de enlaces de hidrógeno de moléculas de agua coordinadas al metal [13] (figura 5). Además de las funciones estructurales de los iones, éstos pueden participar como cofactores de los ARNs con actividad catalítica.

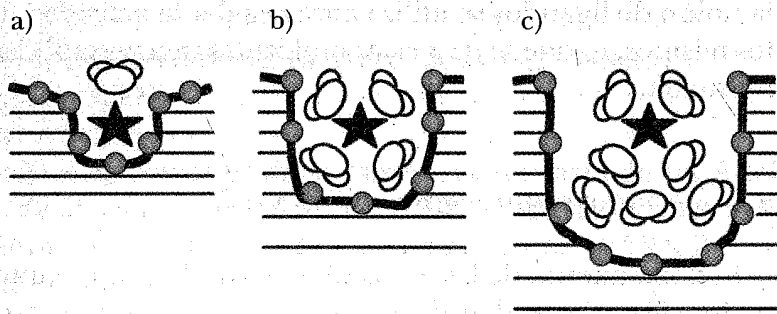


Figura 5. Diferentes modos en que los iones metálicos interactúan con el ARN. Los iones pueden contactar al ARN de manera directa (panel a), mediante moléculas de agua coordinadas al metal (panel b) o por medio de una nube de hidratación (panel c). Los iones están representados por una estrella, las moléculas de agua están delineadas y las esferas sombreadas representan al esqueleto de fosfatos del ARN (modificado de la referencia [13]).

#### 4.2. Interacciones entre proteínas y ARN

En la célula, la mayoría de las veces el ARN funciona en asociación con proteínas para formar complejos ribonucleoproteicos. Primero se unen una o dos proteínas con capacidad de interactuar con el ARN, después otras proteínas se suman para formar un complejo por medio de interacciones proteína-proteína y proteína-ARN. Las proteínas asociadas al ARN tienen diversas funciones, pueden estabilizarlo, protegerlo, empaquetarlo o transportarlo hacia su localización subcelular. Las interacciones entre el ARN y las proteínas pueden involucrar cambios conformacionales grandes y pequeños que permiten la formación de complejos muy estables con estructuras únicas. Los dominios de unión al ARN son muy diversos y las proteínas que unen al ARN pueden presentar varios dominios.

La unión de proteínas puede influenciar el doblado del ARN resultando en la regulación de su función, en la unión ordenada en complejos de ribonucleoproteínas, en el aumento del reconocimiento molecular (especificidad), etcétera. Los dominios presentes en las proteínas que interactúan con el ARN han sido clasificados y se ha encontrado que los más utilizados son el motivo de reconocimiento de ARN, el KH, el K-vuelta y el de unión a ARN de doble cadena [14].

#### 4.3. Cambios conformacionales del ARN

Las moléculas de ARN, al igual que las de las proteínas, son moléculas flexibles. Además de los niveles de estructura revisados con anterioridad, los ARNs pueden cambiar entre varias estructuras relacionadas, mientras llevan a cabo su función. A estos rearrreglos funcionales se les conoce como conformaciones y a la interconversión entre estos estados, como cambios conformacionales. Los cambios conformacionales en el ARN son inducidos por efecto de la vibración térmica y la colisión con otras moléculas, así como por el pegado de un ión o de una molécula de sustrato para el caso de los ARNs con actividad catalítica (ribozimas).

#### 5. EJEMPLO PRÁCTICO: ESTRUCTURA DEL RIBOSWITCH QUE UNE AL PIROFOSFATO DE TIAMINA

Como se verá más adelante, los *riboswitches* son dominios de ARN mensajeros que tienen la capacidad de unirse con una alta afinidad y de manera específica a un metabolito. A su vez, la unión del metabolito provoca un cambio conformacional que afecta la expresión de los genes con-

tenidos en el ARN mensajero. Se encontró que en la región 5' no traducida de genes biosintéticos y de transporte de la vitamina B<sub>1</sub> o tiamina, se encontraba una secuencia altamente conservada en diferentes organismos (bacterias, arqueobacterias, hongos, algas y plantas) a la cual se le denominó THI-box y se determinó que esta secuencia es importante para la expresión de dichos genes [15]. En la figura 6, panel A, se muestra la secuencia ribonucleotídica de la THI-box, es decir, la estructura primaria de este ARN.

Mediante la utilización de programas bioinformáticos como el M-Fold [10] y estudios comparativos de filogenia [16], se pudo formular un modelo de estructura secundaria de la THI-box, la cual se presenta en la figura 6, panel B. La estructura secundaria presenta los siguientes elementos: cinco hélices (llamadas P1 a P5), dos asas terminales (L3 y L5), tres asas internas (J3-2 y J4-5) y una unión de tres hélices, formada por las hélices P1, P2 y P4.

Posteriormente fue posible cristalizar a la THI-box junto con el metabolito que une: el pirofosfato de tiamina. Éste es la forma biológicamente activa de la vitamina B<sub>1</sub> y es cofactor de enzimas importantes del metabolismo de los carbohidratos; está formado por una hidroximetilpirimidina unida a un grupo tiazol y a un grupo pirofosfato. La estructura de la THI-box asemeja un diapasón en el que las puntas están formadas por dos pares de hélices apiladas: la formada por (P2, J3-2, P3 y asa L3) y la formada por (P4, J4-5, P5 y L5), arregladas en una unión de tres hélices con la hélice P1 [17]. Dos asas son importantes para el pegado del pirofosfato de tiamina, el asa J3-2 que une a la hidroximetil pirimidina y el asa J4-5 que une al grupo pirofosfato.

La estructura tridimensional obtenida nos da una clara visión de la interacción entre diferentes elementos de la

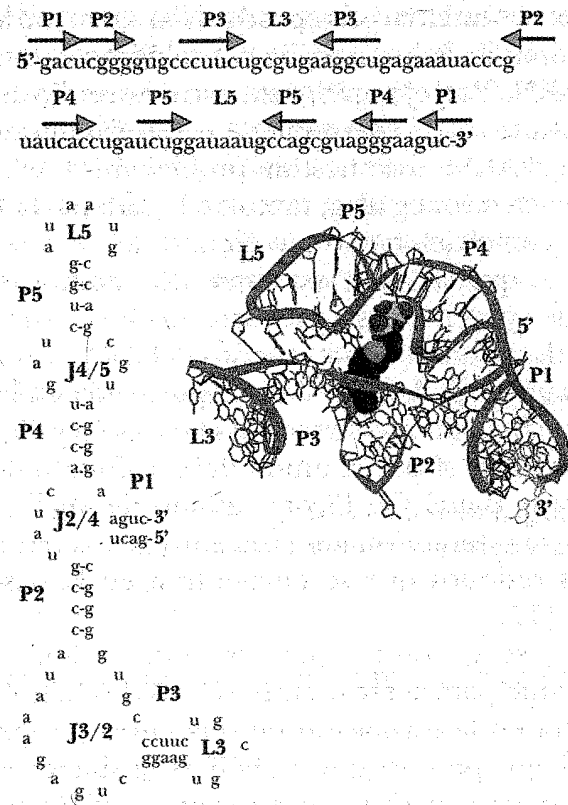


Figura 6. La THI-box, el riboswitch que une al pirofosfato de tiamina. Panel A, estructura primaria (secuencia nucleotídica) de la THI-box presente en la región 5' no traducida del gene *thiM* de *E. coli*, que codifica para una enzima biosintética del pirofosfato de tiamina. Por encima de la secuencia se muestran las regiones que dan origen a las hélices (P1 a P5) así como a las asas terminales (L3 y L5). Panel B, estructura secundaria de la THI-box. Además de las hélices y las asas terminales, se muestran las asas internas que participan en la unión de la pirimidina (J3/2) y del grupo pirofosfato (J4/5), así como el asa (J2/4) que permite que las dos hélices apiladas (P2 y P3) y (P4 y P5) se alineen de forma paralela. Panel C, estructura tridimensional de la THI-box. La THI-box se muestra por medio de una representación de listón. Los átomos del ligando pirofosfato de tiamina se muestran como esferas y coloreadas por elemento. La modelación molecular se realizó con el programa Chimera UCSF (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) [18], usando el archivo pdb 2HOJ.

estructura secundaria para producir la estructura terciaria y de cómo los iones metálicos estabilizan la estructura de este ARN. Por ejemplo, esta estructura dio información relevante sobre cómo es que el pirofosfato de tiamina se une al ARN, una cuestión problemática debido a la naturaleza electronegativa, tanto de la cadena de fosfatos del ARN, como del grupo pirofosfato del pirofosfato de tiamina. Lo que se observó es que dos átomos de  $Mg^{2+}$  son los que ayudan en esta interacción. Otros dos iones de  $Mg^{2+}$  participan en el doblamiento del ARN. Uno asigna curvatura al asa J3-2, de tal forma que ayuda en la unión de la pirimidina. El otro conecta las hélices P3 y P5 cuando se acercan entre sí por la unión del pirofosfato de tiamina (figura 6, panel C). El otro átomo de  $Mg^{2+}$  ayuda a estabilizar la interacción terciaria entre el asa terminal L5 y algunos residuos que se encuentran en la base de la hélice P3 [17].

Además, se encontró que otra interacción terciaria es importante para acercar entre sí a las dos hélices y es la que resulta en la formación de una curva localizada en el asa J2-4, que permite que las hélices se alineen en paralelo. Para que se pueda formar esta curva, se requiere que cuatro bases interactúen entre sí por medio de enlaces de hidrógeno, tanto de la forma canónica, como no canónica, lo que permite unir a cuatro diferentes hebras de ARN en esta región. Por último, la estructura tridimensional también permitió la observación de apareamientos no canónicos como U·U, G·A, A·A, G·G y A·C [17].

## 6. TIPOS Y FUNCIONES DE LOS ARNs

Algunos ARNs son portadores del material hereditario, otros tienen funciones en el flujo de la información genética y algunos más son capaces de interactuar con

otros ARNs por medio de complementaridad de bases o con proteínas para regular su actividad. Dadas las muy diversas formas tridimensionales que los ARNs pueden adquirir en el espacio, algunos de ellos son capaces de presentar actividad catalítica o unir moléculas pequeñas y afectar la expresión genética (tabla 1). Es difícil pensar en otra macromolécula presente en las células que muestre tal versatilidad de funciones.

Tabla 1

### PRINCIPALES TIPOS Y FUNCIONES DE LOS ARNs

- 1) Genomas de ARN.
- 2) ARNs que participan en el flujo de la información genética:
  - ARNs mensajero, de transferencia y ribosomal.
- 3) Ribozimas.
- 4) ARNs que forman parte de complejos ribonucleoproteicos.
- 5) ARNs regulatorios
  - ARNs que modifican la actividad de una proteína.
  - ARNs que funcionan por complementaridad de bases en *cis* (antisentido, ARNsi) y en *trans* (ARNs pequeños: microARNs).
- 6) ARNs que modifican a otros ARNs.
- 7) ARNs que se autorregulan: termosensores y riboswitches.

#### 6.1. Genomas de ARN

Se ha visto que, en algunos casos, el ARN puede funcionar como el portador del material genético de los llamados virus de ARN. El genoma de los virus de ARN

puede ser de cadena sencilla (como en el caso del virus de la hepatitis C o del virus de inmunodeficiencia humana) o de doble cadena (como en los rotavirus que causan gastroenteritis). En ambos casos, el ARN contiene la información para la síntesis de algunas proteínas que forman parte de la estructura de la partícula viral y de otras proteínas que le sirven al virus para replicarse dentro de su célula hospedera. Los viroides son otro grupo de patógenos que sólo consisten de ARN y que no codifican para ninguna proteína. Se piensa que actúan por un mecanismo similar al fenómeno de silenciamiento de ARN. Un ejemplo de estos ARNs es el viroide del tubérculo fusiforme de la papa, cuyo genoma está formado por un ARN de cadena sencilla.

## 6.2. ARNs que participan en el flujo de la información genética: ARNs mensajero, de transferencia y ribosomal

El dogma central de la biología molecular describe el modo en que la información genética fluye en los seres vivos: el ADN se copia a sí mismo en el proceso llamado replicación del ADN; la información contenida en el ADN es copiada por la enzima ARN polimerasa dependiente de ADN, en un ARN mensajero (ARNm) en un proceso conocido como transcripción y, finalmente, las proteínas son sintetizadas usando la información en el ARNm como molde, durante la traducción del mensaje con la participación de los ARNs de transferencia (ARNt) y ribosomal (ARNr) (figura 7). Existen algunos casos en los que el flujo normal de información es diferente, como en el de la transcripción reversa, en el que la información fluye del ARN al ADN (el reverso de la transcripción normal). Esto ocurre en algunos retrovirus, como el virus de inmunodeficiencia humana o VIH. Otro ejemplo es la replicación

del ARN observada en distintos tipos de virus, en el cual un ARN sirve como molde para la síntesis de otra molécula de ARN. Las enzimas que lo copian en otra molécula del mismo tipo son las ARN polimerasas dependientes del ARN, las cuales se encuentran en algunos eucariontes. Actualmente se sabe que están involucradas en el fenómeno de silenciamiento de ARN en las plantas.

El ARN mensajero (ARNm) es el ARN que lleva la información del ADN al ribosoma, que es el sitio de la síntesis de proteínas y en donde se lleva a cabo la traducción de este mensaje. La secuencia codificadora del ARNm

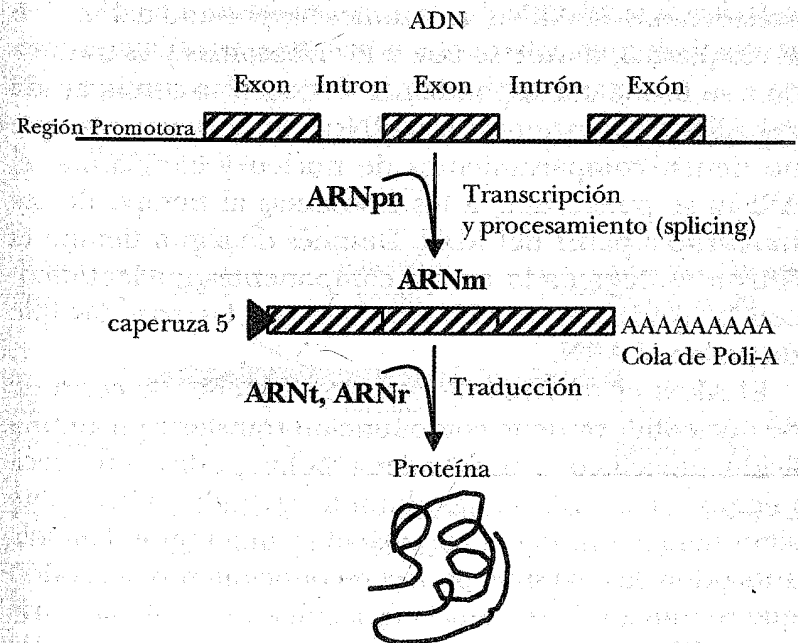


Figura 7. Dogma central de la biología molecular. Los ARNs que participan en el flujo de la información genética en células eucariontes son el ARN mensajero (ARNm), los ARNs pequeños nucleares (ARNpn), el ARN de transferencia (ARNt) y los ARNs ribosomales (ARNr), los cuales se muestran en negritas.

determina la secuencia de aminoácidos en la proteína que es producida. La información genética está codificada de tal forma que cada tres nucleótidos (un codón) dicta la adición de un aminoácido en particular a la cadena polipeptídica naciente. En el caso de las células eucarióticas, una vez que el ARNm precursor (pre-ARNm) se ha transcrito a partir del ADN, es procesado por el *spliceosoma*, un complejo compuesto por proteínas y ARNs nucleares pequeños, para dar lugar al ARNm maduro. Durante este proceso se remueven los intrones, las regiones que no codifican para aminoácidos en el pre-ARNm. Además, se le añade una caperuza y una cola de poliadeninas. El ARNm es entonces exportado del núcleo al citoplasma, donde se une a los ribosomas y es traducido a su forma correspondiente de proteína con la ayuda del ARN de transferencia (ARNt). En las bacterias, que no tienen compartimientos de núcleo y citoplasma, el ARNm se puede unir a los ribosomas al tiempo de ser transcrito a partir del ADN. Después de algún tiempo el ARNm es degradado en sus componentes nucleotídicos con la ayuda de las ARNasas, que son las enzimas que degradan al ARN.

El ARNt es un ARN de tamaño pequeño, de cerca de 80 nucleótidos y tiene como función transferir un aminoácido específico a una cadena polipeptídica en crecimiento en los ribosomas durante la traducción. Tiene sitios para la unión del aminoácido y una región llamada anticodón, la cual sirve para el reconocimiento del codón que se une a una secuencia específica y complementaria en el ARNm, a través de puentes de hidrógeno por medio de complementaridad de bases.

El ARN ribosomal (ARNr) es el componente catalítico del ribosoma. Los ribosomas están formados por ARNr y proteínas, los de eucariontes contienen cuatro diferentes

tipos de ARNr: 18S, 5.8S, 28S y 5S, denominados así por sus coeficientes de sedimentación, obtenidos por centrifugación. Los ribosomas de procariontes están formados por tres tipos de ARNr: 16S, 23S y 5S. Los ribosomas están formados por dos subunidades, la grande que en eucariontes es de 60S y en procariontes de 50S y la subunidad pequeña de 40S y 30S en eucariontes y procariontes, respectivamente (ver figura 8). Los ribosomas unen a los ARNm y llevan a cabo la síntesis de proteínas. El ARNr es muy abundante y representa alrededor del 80% del ARN presente en el citoplasma de una célula eucariote. Es muy importante señalar que de acuerdo a las últimas investigaciones, el ARNr ribosomal es la molécula catalíticamente activa en la formación de los enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas.

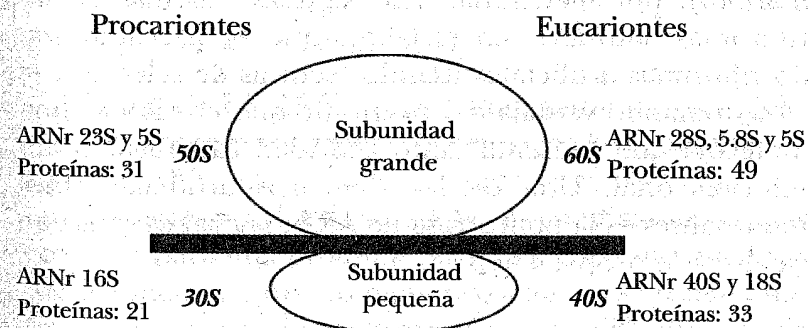


Figura 8. Composición de las subunidades grandes y pequeñas de los ribosomas de procariontes y eucariontes.

### 6.3. Ribozimas (ARNs catalíticos)

Las ribozimas son moléculas de ARN que catalizan una reacción química. Antes de su descubrimiento se pensaba que todos los catalizadores biológicos eran de natura-



leza proteica. Las ribozimas pueden llevar a cabo reacciones como la del rompimiento o síntesis de enlaces fosfodiéster, reacciones de transesterificación o como la de la formación del enlace peptídico que se lleva a cabo en el ribosoma, durante la síntesis de las proteínas [19]. Un ejemplo interesante de ribozima es la enzima ARNasa P, que participa en el procesamiento de los ARNt, del ARNr 5S y del ARN pequeño nuclear U6. La ARNasa P está formada por dos subunidades: una proteína y un ARN. Este último, llamado ARN 10S, es el responsable de la actividad catalítica de esta enzima. Además de estos ejemplos, se conocen otras ribozimas naturales como los intrones de los grupos I y II que son capaces de autoescindirse durante el procesamiento del ARNm o *splicing*, a las ribozimas tipo *hairpin* (pasador) y a las *hammerhead* (cabeza de martillo), por mencionar sólo algunas. Además de las ribozimas naturales, en el laboratorio se han sintetizado ribozimas artificiales usando técnicas de selección *in vitro*, tomando ventaja del hecho de que el ARN es una molécula que presenta tanto actividad catalítica, como informacional. Una de las ribozimas artificiales más interesantes es la polimerasa de ARN, la cual es capaz de catalizar su propia síntesis.

#### 6.4. ARNs que forman parte de complejos ribonucleoproteicos

Además del ARNr, que forma parte del mayor complejo ribonucleoproteico presente en las células, los ribosomas, recientemente se ha identificado una gran cantidad de ARNs que son componentes integrales de otros complejos. Por ejemplo, el ARN presente en la enzima telomerasa, el cual funciona como un templado para la síntesis de los telómeros localizados en los extremos de los cromosomas eucariontes; el ARN 4.5S y el ARN SRP

que forman parte de las partículas de reconocimiento de señales de procariontes y eucariontes, respectivamente, los cuales reconocen y transportan proteínas específicas al retículo endoplásmico en eucariontes o a la membrana plasmática en procariontes; el ARN pequeño nuclear (ARNpn) que por complementariedad de bases identifica los sitios de procesamiento del pre-ARNm (sitios de *splicing*) y que forma parte del *spliceosoma*, un complejo encargado de remover los intrones de los ARNm no procesados; el ARN 10S, que forma parte de la enzima ARNasa P y el ARN de transferencia-mensajero (ARNtm), que se encuentra en muchas bacterias y plástidos y marca a las proteínas codificadas por los ARNm que no tienen codones de paro y de esta manera previene el atascamiento de los ribosomas.

#### 6.5. ARNs con funciones regulatorias

Además de los ARNs que forman parte de complejos enzimáticos importantes en la célula, se han identificado algunos ARNs que funcionan como reguladores, a los que en general se les llama ARNs no codificantes, por no codificar para una proteína [20][21]. Básicamente, estos ARNs funcionan de dos maneras; algunos se unen a una proteína o complejo multiproteico y modifican su actividad y otros interaccionan con ARNm formando una región de doble hélice que impide su traducción o favorece su degradación.

##### 6.5.1. ARNs que modifican la actividad de proteínas

Se han encontrado ARNs que modulan la transcripción ya sea de manera negativa, como es el caso del ARN 6S de bacterias el cual se une a la ARN Polimerasa, o de

manera positiva al estimular la actividad de un factor transcripcional, como el ARN pequeño nuclear humano U1, uno de los componentes del *spliceosoma* el cual estimula la actividad del factor transcripcional TFIID.

Otros ARNs modulan la estabilidad y traducción de algunos ARNm. Por ejemplo, en bacterias existe una proteína llamada CsrA que tiene un papel regulatorio en el metabolismo de carbono, la formación de biopelículas y la motilidad. La proteína CsrA es capaz de unirse a varios ARNm, bloqueando su traducción y estimulando su degradación. El ARN llamado CsrB al unirse a la proteína CsrA, bloquea su función, regulando de esta manera la acción de CsrA. En otro caso, el ARN BCI se une a la proteína FMRP favoreciendo la unión de FMRP a sus ARNm blancos para reprimir la expresión de los mismos. Esta interacción regulatoria es muy importante, ya que se ha encontrado que mutaciones en la proteína FMRP producen el llamado síndrome del cromosoma X frágil, el cual provoca retraso mental y otros problemas en el sistema nervioso en los seres humanos.

#### 6.5.2. ARNs que funcionan por medio de complementariedad de bases

La manera más común en la que los ARNs regulan la expresión genética es al interactuar con sus ARNm blancos por medio de complementariedad de bases. Los ARNs que funcionan de esta manera pueden ser clasificados en dos tipos: los ARNs codificados en *cis*, los cuales están codificados en la misma localización genética, pero en la hebra opuesta a donde están codificados los ARNs a los que regulan y por lo tanto son totalmente complementarios a su ARNm blanco, y los ARNs codificados en *trans*, los cuales se localizan en otro lugar del cromosoma

distinto a donde se encuentran los ARNs sobre los que actúan, razón por la cual presentan una complementariedad laxa con sus blancos.

##### 6.5.2.1. ARNs codificados en *cis*

En el cromosoma de la bacteria *Escherichia coli* existen varios genes que codifican para proteínas tóxicas, que al expresarse, matan a la bacteria. La expresión de dichas proteínas tóxicas se ve impedida por la acción de unos ARNs antisentido que se expresan a partir de la hebra complementaria de los ARNm que codifican a las proteínas tóxicas. Como ejemplos tenemos a los sistemas Ldr (proteína tóxica)/Rdl (ARN antisentido) y Hok (proteína tóxica)/Sok (ARN antisentido). También se ha encontrado en *E. coli* que la expresión del ARN GadY es capaz de aumentar la expresión de la proteína GadX, la cual codifica para la enzima descarboxilasa de ácido glutámico, estabilizando el transcrito por la interacción entre el ARNm de GadX y el ARN GadY.

Los ARNs silenciadores o interferentes (ARNsi) son ARNs de 21-25 nucleótidos, que generalmente se derivan de ARNs de doble cadena de origen exógeno, razón por la cual se piensa que representan un sistema de defensa contra el ARN foráneo. El ARN de doble cadena que entra a una célula primero es cortado en fragmentos de 21 a 25 nucleótidos por un complejo de proteínas que contienen a Dicer, una endonucleasa específica para ARN de doble cadena del tipo ARNasa III. Posteriormente, el complejo silenciador inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), separa los dos fragmentos de ARN y facilita el apareamiento con un ARNm blanco que es complementario a su secuencia de bases. Este ARNm blanco es cortado dentro de la secuencia complementaria,

por una proteína llamada Argonauta, también parte del complejo RISC (ver figura 9).

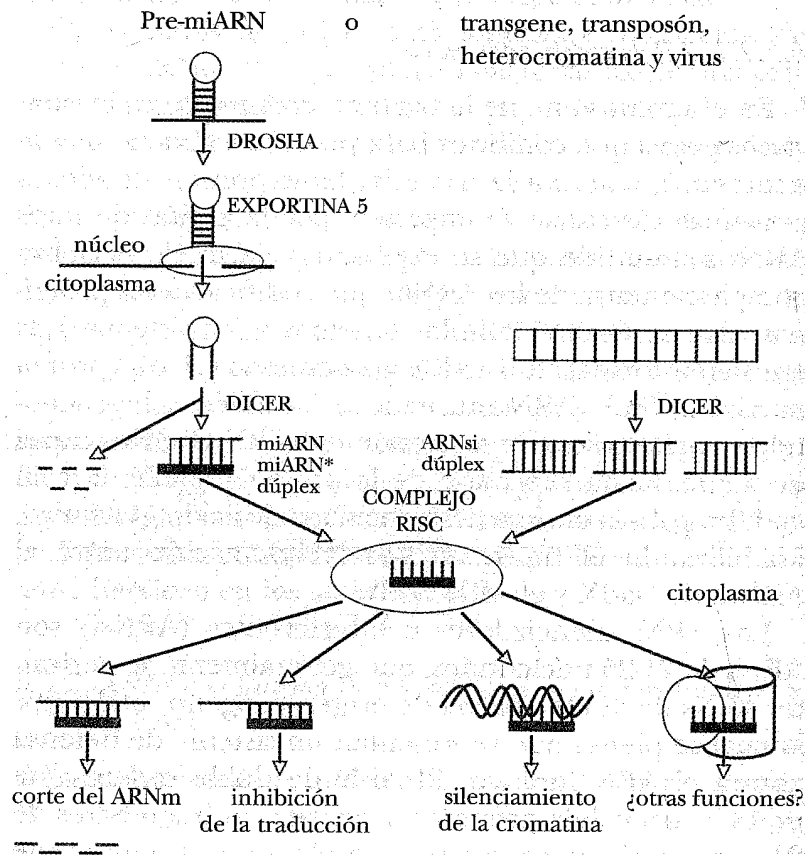


Figura 9. Procesamiento y funciones de los microARNs (miARNs) y de los ARNs silenciadores (ARNsi). La biogénesis de los miARN y los ARNsi se muestra a la izquierda y a la derecha de la figura, respectivamente.

### 6.5.2.2. ARNs codificados en trans

Se conocen muchos ejemplos de ARNs que regulan la expresión de genes de bacterias y eucariontes en *trans*. En bacterias, y en particular en *E. coli*, se han caracterizado una docena de ellos. Actúan de diferentes maneras, ya sea promoviendo la degradación de los ARNm o bien, activando o inhibiendo la traducción de los mismos. Para su funcionamiento requieren unirse a la proteína Hfq, la cual es una chaperona de ARN que presenta una gran similitud a la proteína Sm, uno de los componentes del *spliceosoma* en eucariontes y arqueobacterias. Los ARNs MicC, MicF y Spot42 representan ejemplos de ARNs que bloquean la traducción, al unirse a sus ARNm blancos y de esta manera reprimen la expresión de las proteínas de membrana OmpC y OmpF y de la enzima galactocinasa GalK, respectivamente. Otros ARNs como DsrA y RprA activan la traducción de sus ARNm blanco, promoviendo la traducción de RpoS, el factor sigma de estado estacionario. Ejemplos de ARNs que afectan la estabilidad de su ARNm blanco son RyhB, el cual provoca la degradación de ARN mensajeros que codifican para proteínas que contienen hierro y SgrS, el cual regula negativamente la traducción y estabilidad del ARNm del gene *ptsG*, que codifica para una proteína transportadora de glucosa, con el fin de contrarrestar los efectos del estrés por fosfoazúcares, el cual se observa al aumentar los niveles intracelulares de glucosa-6-fosfato. Este ARN es bifuncional, ya que además de regular por complementariedad de bases la traducción y estabilidad del gene *ptsG*, codifica para una proteína de 43 aminoácidos que, se cree, también interviene en el combate del estrés por fosfoazúcares, por un mecanismo hasta ahora desconocido.

En eucariontes, a los ARNs que regulan en *trans* se les conoce como microARNs (miARNs). Se les ha encontrado en gusanos, moscas, plantas y en vertebrados [22]. Al aparearse con sus ARNm blanco, regulan su estabilidad o su traducción. Presentan un tamaño de 22 nucleótidos y son procesados por las mismas enzimas que generan los ARNsi a partir de ARNs de mayor longitud y que presentan estructuras de tallo y asa (figura 9). Una diferencia notable entre los ARNsi y los miARNs es que estos últimos presentan especificidad de hebra y extremos definidos, mientras que los ARNsi pueden ser generados en cualquier lugar a lo largo de la longitud del ARN de doble cadena. Los primeros miARNs que se descubrieron son los llamados lin-4 y lin-7 del gusano *Caenorhabditis elegans*. Estos miARNs interactúan por medio de apareamiento de bases con las secuencias complementarias en el extremo 3' de sus ARNm blancos, lin-14 y lin-41, respectivamente. Estas interacciones por complementaridad bloquean la traducción de los ARNm blancos y en algunos casos provocan su degradación. Se ha observado que la habilidad de los miARNs para bloquear la traducción depende en gran medida de los primeros 8 nucleótidos en el extremo 5' de los mismos. Algunos miRNAs provocan el fenómeno del silenciamiento de cromatina. Actualmente se reconoce que los miARNs están involucrados en una gran variedad de procesos biológicos incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y el desarrollo.

#### 6.5.3. ARNs que participan en el procesamiento o modificación de otros ARNs

Algunos ARNs tienen como función la modificación de otros ARNs. Por ejemplo, los intrones son removidos

de los pre-ARNm por los *spliceosomas*, los cuales contienen ARNs pequeños nucleares, o bien, los intrones pueden codificar a ribozimas de tal modo que se remueven a sí mismos. El ARN puede ser modificado en cualquiera de sus bases. En eucariontes, las modificaciones de los nucleótidos del ARN se llevan a cabo por los ARNs nucleolares pequeños, los cuales se encuentran en el nucleolo y los cuerpos de Cajal. Los ARN nucleolares pequeños se asocian con enzimas, para dirigir las mediante complementariedad de bases hacia el ARN que será modificado. Estas enzimas son las que llevan a cabo la modificación. Aunque la mayoría de las veces son los ARNr y ARNt las moléculas modificadas, algunos ARNm y ARN nucleolares pequeños también pueden ser el blanco de dichas modificaciones.

#### 6.5.4. ARNs que se autorregulan

A diferencia de los ARNs anteriores, estos ARNm contienen dominios capaces de formar estructuras secundarias que pueden ser desnaturalizadas por temperatura (en el caso de los termosensores) o estructuras tridimensionales complejas que pueden reconocer específicamente a un metabolito y afectar la expresión de los genes contenidos en dicho ARNm (*riboswitches*) [23].

##### 6.5.4.1. Termosensores

Como se ha visto, las moléculas de ARN son capaces de interactuar intramolecularmente para formar estructuras secundarias de tallo y asa, las cuales pueden cambiar su conformación en respuesta a señales físicas o químicas. Los termómetros de ARN o termosensores responden a la temperatura, utilizando el conocido hecho de que las

hélices que forman los ácidos nucleicos se desnaturalizan conforme aumenta la temperatura (ver figura 10, panel A). Uno de los ejemplos más ilustrativos que usan esta propiedad se observa en la expresión de algunos genes de virulencia. En *Listeria monocytogenes*, una bacteria patógena que se encuentra en alimentos contaminados, la proteína PrfA que promueve la expresión de genes de virulencia, no se produce aun cuando su ARNm sí es sintetizado. La explicación a este fenómeno es que a temperatura ambiente (20°C) se forma una estructura secundaria en el ARNm que impide que los ribosomas se unan a él. Cuando la bacteria es ingerida por un mamífero, el cambio de temperatura a 37°C provoca la desnaturalización de la estructura de tallo y asa, lo cual permite la unión de los ribosomas con la consecuente producción de la proteína PrfA y de todos los genes de virulencia regulados por esta proteína.

#### 6.5.4.2. Riboswitches

Los *riboswitches* son regiones de un ARNm que, sin la intervención de proteína alguna, pueden unir a un metabolito en particular y de esta forma afectar la expresión de los genes contenidos en dicho ARNm. De esta manera, un ARNm que contiene un *riboswitch* se autorregula, dependiendo de la presencia o ausencia del metabolito. Aunque la mayoría de los *riboswitches* se han descubierto en bacterias, la THI-box mencionada anteriormente, se ha encontrado también en eucariontes (plantas, algas y hongos) y en arqueobacterias.

Los *riboswitches* están formados por dos dominios: un aptámero y una plataforma de expresión (figura 10, panel B). El aptámero es el encargado de unir al metabolito, mientras que la plataforma de expresión sufre

una serie de cambios conformacionales en respuesta a la unión del metabolito al aptámero. La plataforma de expresión es la responsable de regular la expresión genética. Generalmente las plataformas de expresión reprimen la expresión genética en respuesta a la unión del metabolito al aptámero, pero se han encontrado algunos ejemplos en los que el pegado del metabolito aumenta la traducción del ARNm que lo contiene.

Las diferentes plataformas de expresión asociadas a los *riboswitches* provocan: a) la formación de estructuras de tallo y asa que producen la terminación de la transcripción; b) la formación de estructuras secundarias que enmascaran al sitio de unión a ribosomas, lo que impide que se inicie la traducción; c) el corte del ARNm por una ribozima contenida en el *riboswitch* que se corta a sí mismo en presencia de una concentración suficiente del metabolito; d) un *splicing* alternativo del pre-ARNm cuando el *riboswitch* THI-box se une al pirofosfato de tiamina, fenómeno que se observa en algas, hongos y plantas (figura 10, panel C).

A la fecha, además del que une al pirofosfato de tiamina, se conocen 16 diferentes *riboswitches* que unen y regulan la biosíntesis y el transporte de otras vitaminas como la riboflavina y la cobalamina, de las nucleobases adenina y guanina, de la 2'-desoxiguanosina, de la prequeosina (un análogo de guanina, que es reconocida por dos diferentes clases de *riboswitches*), de los aminoácidos lisina y glicina, de la S-adenosil metionina (del cual se conocen cuatro variedades diferentes entre sí) y de la S-adenosil homocisteína, de la molécula señalizadora di-GMP cíclico y de la glucosamina-6-fosfato, cuyo *riboswitch* se convierte en una ribozima al unir a su metabolito.

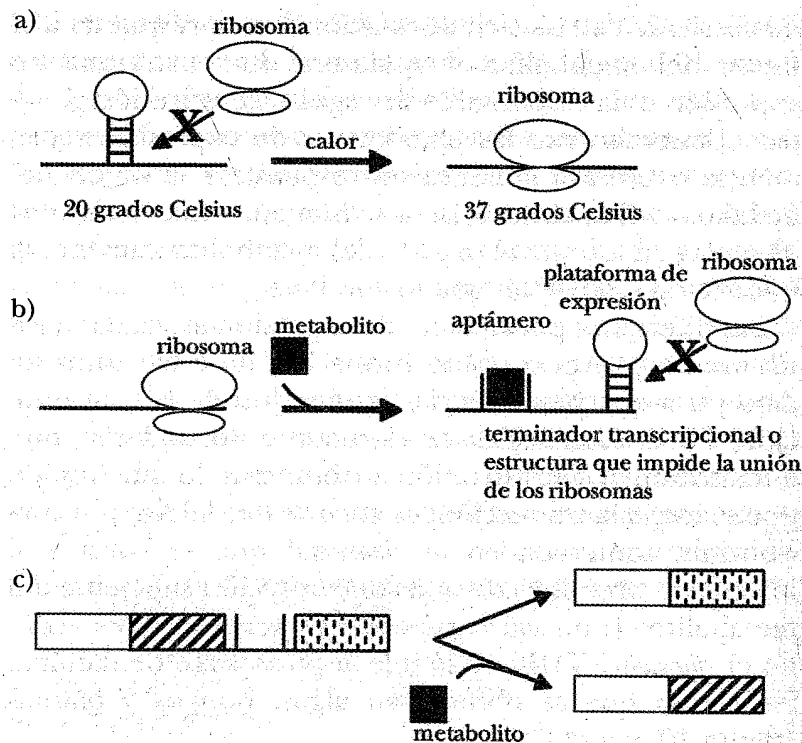


Figura 10. ARNs que autorregulan su expresión. Panel a). Los termosensores presentan una estructura secundaria que, al aumentar la temperatura, se desnatura, permitiendo la unión de los ribosomas y por lo tanto la traducción de los ARNm que los contienen. Panel b). Los riboswitches están formados de dos dominios, el aptámero y la plataforma de expresión. Cuando el metabolito se une al aptámero, provoca cambios conformacionales en la plataforma de expresión como son la formación de estructuras que impiden la transcripción o la traducción del ARNm. Panel c). El riboswitch que une al pirofosfato de tiamina; al unirse a esta vitamina, produce un "splicing" alternativo en el pre-ARNm que lo contiene en algas, hongos y plantas.

## 7. CONCLUSIONES

Probablemente el ARN es la molécula más versátil, en cuanto a funciones se refiere, que se pueda hallar dentro de las células, ya que además de ser portador de la información genética y participar en su desciframiento, es capaz de reconocer a otras moléculas con una gran afinidad y especificidad, y, además, en algunos casos, presenta actividad catalítica, una característica que se creía exclusiva de las proteínas.

Esta versatilidad de funciones llevó a algunos investigadores a plantear que antes de que surgieran las células modernas tal como las conocemos, existió un "mundo del ARN", en el que el ARN almacenaba la información genética y además catalizaba las reacciones químicas en las células primitivas, funciones que después serían realizadas por el ADN y las proteínas, respectivamente. Aunque es imposible obtener una confirmación experimental sobre la existencia del "mundo del ARN", el conocimiento adquirido en los últimos años sobre la estructura y función de esta molécula, así como el descubrimiento de ARNs dotados de novedosas funciones que nos depara el futuro, nos hace pensar que en la actualidad estamos viviendo un "nuevo" mundo del ARN.

## AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a las maestras en ciencias María Teresa Fernández Luna y Mónica Miranda Ríos por su ayuda en la elaboración de algunas de las figuras de este capítulo.

## REFERENCIAS

1. K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling y T. R. Cech, *Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena*, *Cell* **31**, 147-157 (1982).
2. C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace y S. Altman, *The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme*, *Cell* **35**, 849-857 (1983).
3. L. E. Orgel, *Evolution of the genetic apparatus*, *J. Mol. Biol.* **38**, 381-393 (1968).
4. F. H. C. Crick, *The origin of the genetic code*, *J. Mol. Biol.* **38**, 367-379 (1968).
5. A. Z. Fire, *Gene silencing by double-stranded RNA* (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 6966-6984 (2007).
6. C. C. Mello, *Return to the RNAi world, rethinking gene expression and evolution* (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 6985-6994 (2007).
7. P. Kapranov, A. T. Willingham y T. R. Gingeras, *Genome-wide transcription and the implications for genomic organization*, *Nat. Rev. Genet.* **8**, 413-423 (2007).
8. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter, *Biología Molecular de la Célula*, cuarta edición, Editorial Omega, España (2004).
9. I. L. Hofacker, M. Fekete y P. F. Stadler, *Secondary structure prediction for aligned RNA sequences*, *J Mol Biol.* **319**, 1059-1066 (2002).
10. M. Zuker, *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*, *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406-3415 (2003).
11. R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, E. Westhof, coordinadores, *Handbook of RNA Biochemistry*, Wiley-VCH Verlag GMBH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania (2005).
12. S. R. Holbrook y S. H. Kim, *RNA crystallography*, *Biopolymers* **44**, 3-21 (1997).
13. D. E. Draper, *A guide to ions and RNA structure*, *RNA*, **10**, 335-343 (2004).
14. B. M. Lunde, C. Moore y G. Varani, *RNA-binding proteins, modular design for efficient function*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 479-490 (2007).
15. J. Miranda-Ríos, M. Navarro y M. Soberón, *A conserved RNA structure (THI-box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9736-9741 (2001).
16. D. A. Rodionov, A. G. Vitreschack, A. A. Mironov y M.S. Gelfand, *Comparative genomics of thiamin biosynthesis in prokaryotes. New genes and regulatory mechanisms*, *J. Biol. Chem.* **277**, 48949-48959 (2002).
17. J. Miranda-Ríos, *The THI-box riboswitch, or how RNA binds thiamin pyrophosphate*, *Structure* **15**, 259-265 (2007).
18. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng y T. E. Ferrin, *UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis*, *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612 (2004).
19. S. A. Strobel y J. C. Cochrane, *RNA catalysis, ribozymes, ribosomes, and riboswitches*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 636-643 (2007).
20. S. Gottesman, *The small RNA regulators of Escherichia coli, roles and mechanisms*, *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 303-328 (2004).
21. G. Storz, S. Altuvia y K. M. Wassarman, *An abundance of RNA regulators*, *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 199-217 (2005).
22. N. Bushati y S. M. Cohen, *MicroRNA functions*, *Annu. Rev. Cell & Dev. Biol.* **23**, 175-205 (2007).
23. F. J. Grundy y T. M. Henkin, *From ribosome to riboswitch, control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements*, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 329-338 (2006).

## **CAPÍTULO 5 LA VARIABILIDAD GENÓMICA Y SUS IMPLICACIONES EN EL CUIDADO DE LA SALUD**

**GERARDO JIMÉNEZ-SÁNCHEZ,  
ENRIQUE HERNÁNDEZ LEMUS\*  
y ALFREDO HIDALGO-MIRANDA**  
*Instituto Nacional de Medicina Genómica  
México, D. F.*

### **I. INTRODUCCIÓN**

El conocimiento de la secuencia del genoma humano y el consecuente manejo de enormes cantidades de datos genómicos, han impulsado significativamente el estudio de las ciencias genómicas. Mas aún, el conocimiento de sus variaciones confieren individualidad a cada miembro de la especie humana y ofrece nuevos y diversos retos científicos y tecnológicos para las sociedades contemporáneas.

Una de las áreas de mayor interés en la genómica es la inherente a las aplicaciones médicas del genoma humano, en particular para aquellas enfermedades más comunes y con altos costos sociales y financieros. Su desarrollo comienza a tomar forma y se advierte que tendrá impacto inicial en la prevención de enfermedades comunes y la reducción de efectos adversos de los fármacos de uso

\* ehernandez@inmegen.gob.mx



frecuente en la práctica médica. Se prevé también que este conocimiento permitirá hacer recomendaciones para un cuidado de la salud más individualizado.

El estudio de la secuencia del genoma humano ha permitido conocer principios biológicos importantes; además de que se han encontrado diferentes formas de variación entre individuos. Si bien hoy se conocen diversos tipos de variaciones en la estructura del genoma humano, este capítulo se enfocará a las más frecuentes, es decir, a los polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms* o SNPs por sus siglas en inglés).

A lo largo del texto se describen algunos de los instrumentos básicos para el análisis del genoma humano, haciendo énfasis en principios fisicoquímicos fundamentales para comprender mejor los procesos biológicos y los procedimientos experimentales que participan en el estudio de la variabilidad genómica y sus implicaciones en el cuidado de la salud.

## 2. EL GENOMA HUMANO

Los seres humanos estamos formados por trillones de células y, aunque las que constituyen los diferentes tejidos muestran características morfológicas y funcionales diferentes, todas comparten una copia completa e idéntica del genoma humano, la cual no se expresa de forma simultánea en una misma célula sino que a lo largo del desarrollo se seleccionan grupos de genes que determinan su futuro estructural y funcional. Así, todas las células de nuestro organismo proceden, por divisiones sucesivas, de una célula precursora común que comparte una información materna y paterna para constituir su propio genoma, y las características morfológicas y funcionales

propias de cada tipo celular dependen básicamente del grupo particular de genes que ahí se expresan.

El ácido desoxirribonucleico o ADN es la molécula responsable de la información genética y, por lo tanto, de la herencia. Esta molécula se forma de 3200 millones de nucleótidos, organizados en forma de una doble cadena. Existen cuatro nucleótidos que forman el genoma humano y cada uno de ellos dispone de tres elementos: una base nitrogenada, un azúcar (la desoxirribosa) y un grupo fosfato. La base es la verdaderamente responsable de la especificidad de la información y existen cuatro diferentes, que se identifican con las letras A (adenina), G (guanina), C (citosina) y T (timina), y representan las cuatro letras con las cuales se escribe el libro de la vida (figura 1). El resto de los componentes del nucleótido (el azúcar y el grupo fosfato) desempeñan una función estructural y facilitadora de la polimerización, mediante el enlace consecutivo de los diferentes nucleótidos.

Estructuralmente, el ADN es una molécula de doble cadena, cada una de las cuales está dirigida en sentido antiparalelo y ambas cadenas forman una estructura en espiral en donde los grupos azúcar-fosfato constituyen el esqueleto o armazón que representan los laterales paralelos de la escalera de caracol, mientras que las bases nitrogenadas están orientadas hacia el eje central de la espiral y representan el equivalente a los peldaños de una escalera. El apareamiento de las bases entre ambas cadenas antiparalelas se lleva a cabo con una extraordinaria especificidad, de acuerdo con la siguiente regla: adenina siempre se aparea con timina (A-T) y citosina con guanina (C-G) y cada 10 pares de bases forman una vuelta completa de la hélice.

El genoma humano contiene cerca de 23000 genes que son sus unidades funcionales y constituyen cerca del

2% de la cadena. Los genes son segmentos de la secuencia que contienen la información para la generación de proteínas, las cuales llevan a cabo las funciones biológicas

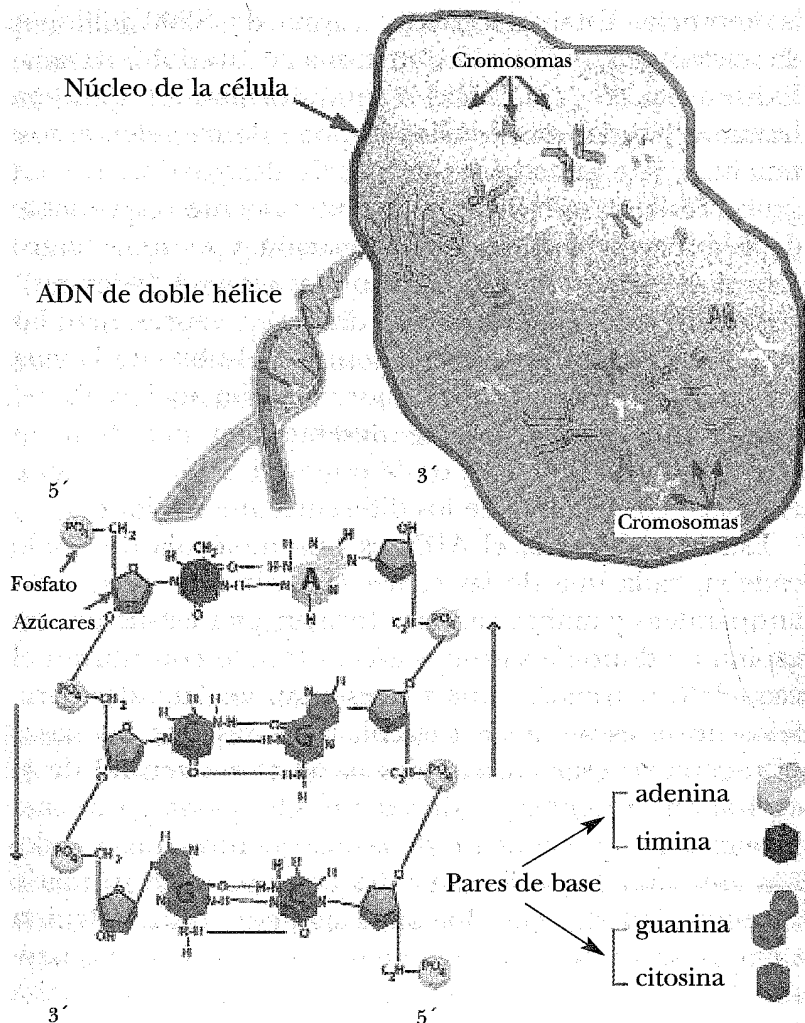


Figura 1. Ubicación y estructura básica del ácido desoxirribonucleico. Derechos reservados ©INMEGEN, México.

dentro del organismo humano (figura 2). La información contenida en el ADN es decodificada en dos etapas consecutivas denominadas transcripción y traducción. El proceso de la transcripción genera un intermediario conocido como ARN (ácido ribonucleico) a través del cual se generan proteínas mediante el proceso de la traducción, que supone la formación de secuencias de aminoácidos a partir del código basado en la secuencia, formando proteínas.

El genoma humano tiene funciones de gran relevancia, tanto en el propio individuo como en la preservación de la información genética a través de la evolución, el ADN debe garantizar la estabilidad de esta información, que será transmitida a sus propias células y a su descendencia.

#### Estructura de un gen

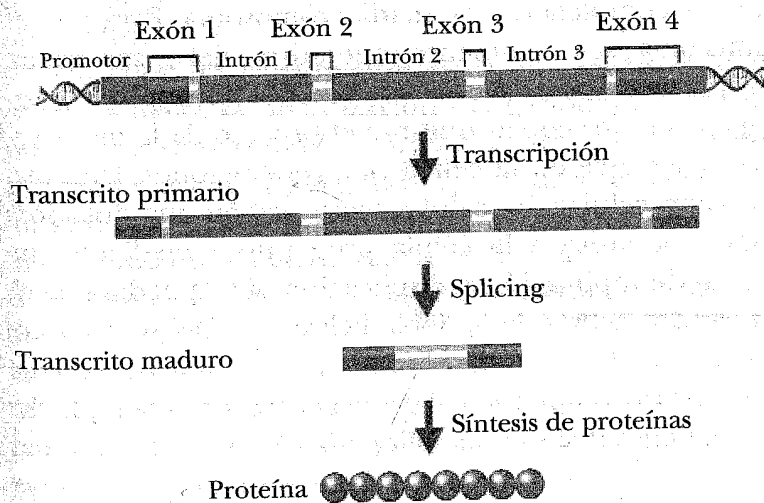


Figura 2. Estructura de los genes dentro del genoma humano y el proceso de transcripción por el cual se produce el intermediario RNA con la información para generar proteínas a través del proceso de traducción. ©INMEGEN, México, D. F.

Para garantizar su estabilidad el genoma no sólo se encuentra protegido y localizado en compartimentos específicos dentro de la célula, sino que además se establecen mecanismos de control que garantizan la ausencia de errores al realizar las copias del mismo, lo cual permite apreciar el elevado grado de estabilidad de la información en el proceso de la herencia. Sin embargo, el genoma humano no es una molécula absolutamente estable, sino que puede ser objeto de diferentes tipos de cambios denominados mutaciones, que pueden llegar a ser transmitidas a la descendencia cuando estos cambios afectan a las células germinales.

El ADN no se encuentra en la célula como molécula desplegada y desnuda sino que habitualmente se repliega sobre sí mismo y se asocia con otras moléculas, fundamentalmente proteínas, para generar una estructura más estable y compleja denominada cromosoma. Para que el cromosoma sea realmente operativo, debe ser capaz de replicarse (realizar una copia exacta de sí mismo), segregarse en dos copias durante el proceso de la mitosis y autoconservarse en la célula por generaciones. Durante la división celular, las células hijas reciben una dotación genética idéntica a la célula progenitora mediante un proceso de replicación o duplicación del ADN durante el cual, las dos hebras de la doble hélice de ADN se separan y cada una de ellas sirve de molde para generar una nueva hebra complementaria, de acuerdo con la regla de apareamiento de bases mencionada (A-T y C-G). La transmisión o herencia de esta información en el ADN es de tipo semiconservativa, de tal forma que cada una de las células hijas recibe una hebra de nueva síntesis y su complementaria antigua, que sirvió de molde para generar la nueva.

El genoma humano está constituido por un genoma nuclear y otro mitocondrial. Su mayor parte se localiza dentro del núcleo de la célula (genoma nuclear) el cual está separado del resto por una envoltura nuclear que limita y regula el intercambio que se establece entre el interior del núcleo y el exterior del mismo donde se encuentra la maquinaria relacionada con la decodificación de la información genética, responsable en última instancia, de la síntesis de proteínas. Cada cromosoma nuclear está constituido por una sola cadena de ADN asociada a proteínas, con una longitud de 1.7 a 8.5 cm, que contiene entre 50 y 250 millones de pares de bases de nucleótidos. Sin embargo, esta molécula habitualmente se encuentra en grados de mayor o menor empaquetamiento lo cual permite que todo el genoma humano pueda ser almacenado en el espacio nuclear de la célula, que tiene un diámetro cercano a cinco milésimas de milímetro.

Una cuestión relevante es pues, el plegamiento del ADN, es decir, la organización del genoma en un volumen cuyas dimensiones son muchos órdenes de magnitud menores que su longitud [2]. El ADN resulta en una longitud de poco más de un metro y medio y está constituido como un polímero altamente cargado (cerca de una carga fundamental por cada dos ångstrom) y difícil de doblar (con una longitud de persistencia de unos 50 nm). Esta larga cadena debe condensarse para formar los cromosomas que se alojan en el núcleo celular. Durante este proceso de condensación se forma un complejo de ADN y proteínas globulares cargadas, llamadas histonas, que se colocan en disposición mutuamente opuestas en forma de cilindros cortos. Usualmente estos agregados son complejos octaméricos consistentes en pares de cuatro histonas esenciales H2A, H2B, H3 y H4.

Un segmento de ADN de alrededor de 147 pares de bases se “envuelve” en un giro súper-helicoidal de 1.75 vueltas a la izquierda alrededor del octámmero de histonas que es luego conectado mediante un segmento de ADN con un complejo similar. Cada agregado de proteína-ADN forma un nucleosoma, cuyas dimensiones son de unos 5 nm de radio y 6 nm de altura. Los nucleosomas son portadores de una carga electrostática negativa de magnitud considerable. Estas estructuras tienden a agregarse dando lugar a fibras [2] (figura 3).

La cromatina, como se le conoce al complejo de ADN (proteínas histonas y proteínas no histónicas durante la interfase), expuesta a concentraciones bajas de sal en solución adquiere una conformación conocida como “fibra de 10 nm” debido al diámetro del complejo. Al incrementarse la concentración de sal hacia condiciones fisiológicas (alrededor de 100 mM) la fibra tiende a engrosarse adquiriendo un diámetro de unos 30 nm. Imágenes de la estructura de cromatina obtenidas a través de criomicroscopía electrónica muestran una disposición de tipo zig-zag a bajas concentraciones de sal, así como una estructura cada vez más compacta cuando la intensidad iónica se acerca a los valores fisiológicos. El comportamiento mecánico e hidrodinámico de las soluciones de nucleosomas es muy complejo y está estrechamente relacionado a la intensidad iónica. En particular llama la atención el hecho de poder lograr cambios significativos en el grado de condensación de la cromatina, con niveles muy modestos de esfuerzo mecánico.

La accesibilidad local del genoma es una necesidad esencial para que se lleve a cabo el proceso de transcripción. Por otra parte, la flexibilidad es una característica de suma importancia, pues durante el ciclo celular cuando el eje mitótico separa a los pares de cromosomas, se

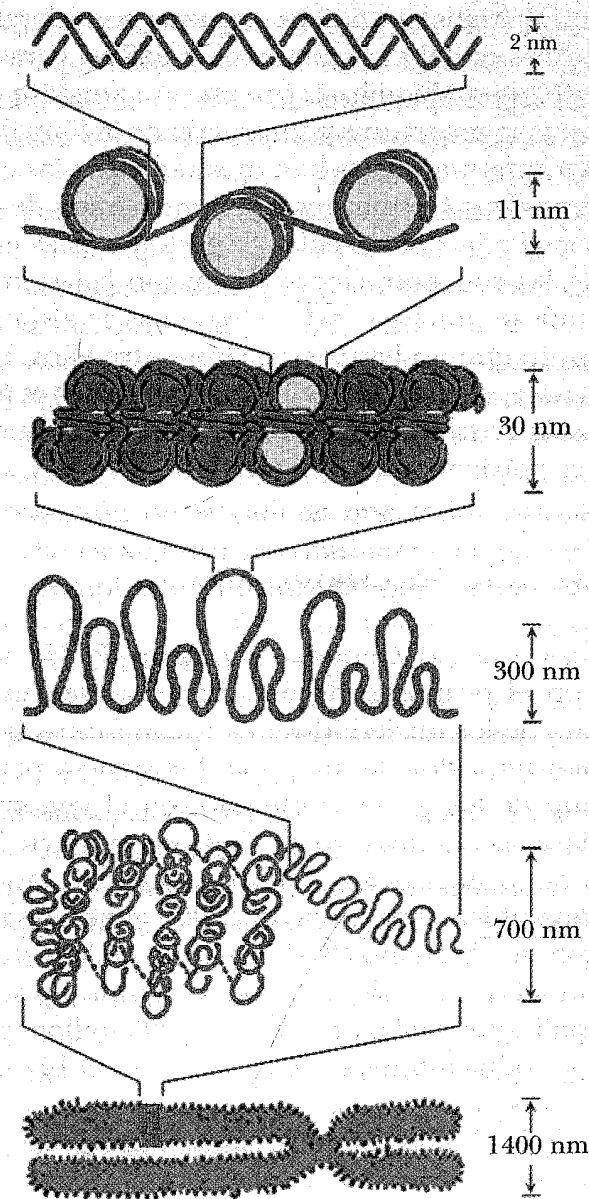


Figura 3. Proceso de compactación del ADN para formar cromosomas.

ejercen esfuerzos mecánicos externos considerables, y la fibra de 30 nm debe ser altamente flexible para soportar estos esfuerzos. Más aún, la interacción atractiva entre los nucleosomas genera una compresión de la fibra de 30 nm. Estudios experimentales han mostrado que las partículas centrales del nucleosoma forman fibras a través de un mecanismo mediado por las colas de histonas ricas en lisinas. Cuando las concentraciones de sal son bajas, la fibra de cromatina se hincha y los nucleosomas se alejan uno de otro por lo que no hay interacción entre ellos. Bajo concentraciones salinas de NaCl iguales o mayores a 40 mM, la fibra de cromatina es mucho más densa y los nucleosomas se aproximan unos a otros.

### 3. EL PROYECTO DEL GENOMA HUMANO

El Proyecto del Genoma Humano (PGH) inició en 1990 con el propósito de descifrar el orden preciso de cada uno de los nucleótidos que lo conforman y generar el primer borrador de un mapa que sirviera para ubicar cada uno de los genes contenidos en el genoma. Once años después, en febrero de 2001 se anunció la culminación del primer borrador de su secuencia, así como el mapa que ubica a los cerca de 23000 genes identificados en el genoma humano [3,4]. Este hito en la historia de la humanidad, resultó del esfuerzo conjunto de seis países industrializados y tuvo un costo de 3000 millones de dólares. La versión completa se dio a conocer el 14 de abril de 2000 [35].

Uno de los hallazgos adicionales más significativos del PGH fue la identificación sistemática de variaciones en la secuencia del genoma humano. En 1998 se hizo manifiesto que las variaciones más comunes en la secuencia,

corresponden a cambios de una sola letra o nucleótido. Los SNPs equivaldrían en un texto a “errores tipográficos” de una sola letra. Hoy sabemos que los SNPs ocurren en promedio cada 400 nucleótidos y que cerca de doce millones de ellos están en la cadena. La gran mayoría de los SNPs son bi-alélicos, es decir, alternan entre dos nucleótidos. Esto significa que en la misma posición del genoma, algunas personas pueden tener, por ejemplo, una A mientras que otras pueden tener una G. Es así, que si bien todos los miembros de la especie humana compartimos el 99.8% de la cadena, el 0.2% restante es el que confiere la individualidad genética a cada miembro de nuestra especie.

La proporción de la cadena que todos compartimos da lugar a las características comunes de la especie humana, por ejemplo, el hecho de que todos los seres humanos tenemos dos ojos, una nariz y una boca en la cara. Sin embargo, las variaciones genómicas hacen que no existan dos caras iguales, sino que cada individuo tenga sus rasgos individuales. En forma similar, todos los seres humanos compartimos reacciones químicas integradas en vías metabólicas, sin embargo, la individualidad genómica confiere particularidades a las proteínas de cada individuo, lo que genera la individualidad bioquímica que, a su vez, influye sobre la forma en que cada persona se adapta al medio ambiente, lo que se traduce en mayor o menor riesgo a padecer enfermedades comunes. De esta forma, quienes genéticamente y, por lo tanto, bioquímicamente tienen mayor predisposición a padecer alguna enfermedad, al modificar su estilo de vida se puede retrasar o evitar su presencia.

#### 4. LA MEDICINA GENÓMICA

La medicina genómica, que se define como la identificación de las variaciones en el genoma humano que confieren riesgo a padecer enfermedades comunes, dará lugar a una práctica médica más individualizada, más preventiva y predictiva. Esta nueva disciplina ofrece grandes beneficios para el cuidado de la salud, dado que permitirá identificar a los individuos con riesgo a desarrollar enfermedades comunes antes de que aparezcan sus manifestaciones clínicas, y así evitar o retrasar su aparición, complicaciones y secuelas. Además, dará lugar a nuevas estrategias de tratamiento como la farmacogenómica que resultará en la generación de medicamentos más efectivos y menos tóxicos con base en la estructura genómica de cada población.

Los retos inmediatos a los que se enfrenta la medicina genómica incluyen el conocimiento y análisis de las secuencias que incrementan el riesgo o la susceptibilidad para desarrollar enfermedades multifactoriales, así como el estudio de su frecuencia dentro de las poblaciones. Con ello, se podrán identificar a los miembros de la población cuya secuencia de ADN los hace de alto riesgo para presentar enfermedades comunes como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus tipo II, el asma, el infarto agudo del miocardio y el cáncer entre otras, que están adquiriendo gran relevancia en México debido a la transición epidemiológica.

#### 5. IMPLICACIONES MÁS ALLÁ DE LA SALUD

La medicina genómica tiene implicaciones más allá de la salud ya que, además de impulsar el desarrollo científico

y tecnológico, tendrá un impacto financiero significativo al reducir los costos de atención de las enfermedades más frecuentes. También, generará nuevos productos y servicios, que darán lugar a formas novedosas de comercio, comunicaciones e incluso, de organización social. Es por ello, que la medicina genómica se ha constituido como un instrumento estratégico para el desarrollo de las naciones.

Como en el caso de otras tecnologías médicas cuya aplicación masiva puede contribuir al desarrollo y crecimiento económico de los países, la medicina genómica ofrece una gran oportunidad para atender problemas mundiales de salud como los que aquejan a la población mexicana. La participación del gobierno federal con el establecimiento y consolidación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN, [www.inmegen.gob.mx](http://www.inmegen.gob.mx)), resulta de gran trascendencia al representar el instrumento que estimulará su desarrollo coordinado a nivel nacional, asegurando que sus beneficios sean accesibles a quienes cuentan con menos recursos [6]. Por el contrario, la falta de este instrumento en forma oportuna creará una mayor brecha entre quienes tienen más y quienes tienen menos, ya que los productos y servicios llegarían de los países desarrollados para estos últimos.

#### 6. ESTRUCTURA DEL GENOMA HUMANO EN BLOQUES DE RECOMBINACIÓN

La generación de células germinales incluye el intercambio de material genético de los dos progenitores. Los miembros de cada par de cromosomas se juntan e intercambian fragmentos entre sí, dando como resultado la generación de nuevos cromosomas formados por segmentos de cada uno de los progenitores y pasándolos a la

siguiente generación. A través de las generaciones, los cromosomas resultan estar formados por bloques aportados por los ancestros de ese linaje, siendo algunos de estos bloques compartidos entre múltiples individuos (figura 4). Estos bloques, que no han sido interrumpidos por recombinación, se encuentran flanqueados por sitios en donde ésta ocurrió.

Los SNPs que se encuentran físicamente cercanos entre sí tienden a heredarse juntos mientras el segmento no sea interrumpido por un sitio de recombinación, es decir, en tanto se encuentren en desequilibrio de ligamiento. Estas variaciones ligadas unas con otras se llaman haplotipos [7-9], que son combinaciones de dos o más polimorfismos localizados en un mismo cromosoma, los cuales cosegregan juntos a la siguiente generación. El conocimiento de los límites de los bloques de haplotipos es de gran relevancia, pues ofrecen la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias que permitan el estudio masivo del genoma humano en forma más rápida y a un costo menor.

Por ejemplo, un bloque de recombinación de 20000 letras o nucleótidos (20 kb) podría contar con cerca de 50 SNPs. Si se pudiera identificar la combinación de los SNPs que forman cada uno de los posibles haplotipos, bastaría con conocer unos cuantos SNPs del bloque (etiqueta de SNPs) para reconocer el resto de los SNPs en dicho bloque. Así, podríamos distinguir una versión del bloque frente a otra y, con ello, estudiar simultáneamente la asociación de los SNPs contenidos en cada bloque con diferentes enfermedades, en forma más rápida y menos costosa. Concretamente, el costo de conocer los SNPs contenidos en un bloque de 20000 letras, sería el equivalente al costo de analizar los 6 a 8 SNPs que forman la etiqueta. Así, si conociéramos la estructura de

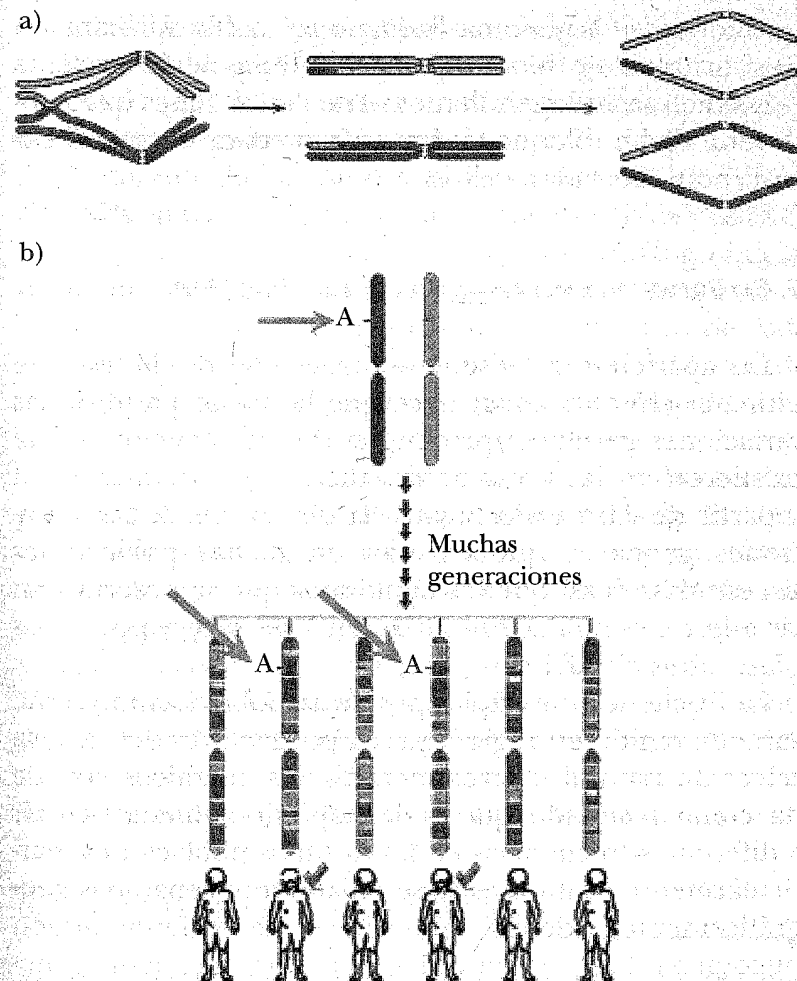


Figura 4. a) Proceso de recombinación que ocurre durante la generación de células germinales en la meiosis. Se trata de un intercambio físico de material genético entre cromosomas de células somáticas que genera una estructura mixta de los cromosomas a partir del genoma del individuo del cual se generan. b) A través de múltiples generaciones, la recombinación genética da como resultado bloques de recombinación a lo largo de todo el genoma. La letra A indica una variación asociada a algún rasgo o enfermedad que se hereda como parte de un bloque de recombinación, por lo que la identificación de bloques comunes a quienes tienen dicho rasgo contribuye a encontrar las variaciones genéticas asociadas a ellos.

los bloques del genoma humano, el costo aproximado para estudiar un bloque de 20000 letras sería cuarenta veces menor, independientemente de los genes que contuviera dicho bloque o las enfermedades que se encontraran asociadas a ellos.

## 7. EL PROYECTO INTERNACIONAL DEL HAPMAP

La aparición relativamente reciente de la especie humana (150000 años) hace que la mayor parte de las variaciones genéticas provengan de las variaciones que existieron en las poblaciones ancestrales. La migración a partir de África dio lugar a la dispersión de las variaciones genéticas que existían en dichas poblaciones ancestrales; es así que los haplotipos que se observan en las diferentes poblaciones tienden a ser subgrupos de los observados en África.

La frecuencia de haplotipos en la población moderna varía de región en región, ya sea por factores del azar, la selección natural u otros mecanismos genéticos, lo que da como resultado que cada haplotipo pueda ocurrir a diferentes frecuencias en las distintas poblaciones, particularmente cuando éstas se encuentran separadas geográficamente. Además, mutaciones de reciente origen pueden dar lugar a nuevos haplotipos cuya reciente generación limita su dispersión mas allá de la población o la región en que se originaron.

La investigación sobre el genoma humano y sus implicaciones médicas ha tomado un nuevo giro, orientando el conocimiento de las particularidades genómicas de las diferentes poblaciones mundiales con el fin de facilitar y reducir los costos en su estudio y el desarrollo de sus beneficios médicos [10,11]. Surge así el proyecto inter-

nacional HapMap, cuyo objetivo es la elaboración de un catálogo de bloques de haplotipos en el genoma humano (figura 5) [12]. El proyecto comenzó en el mes de octubre de 2002 y su primera fase concluyó el 26 de octubre de 2005; durante dicha fase se analizaron cerca de un millón de SNPs en tres poblaciones: africana, caucásica y asiática [13]. Los resultados iniciales incluyen el catálogo inicial de bloques genómicos en esas poblaciones, así como la identificación de algunas variaciones exclusivas de cada una de ellas. Además se documentaron sitios "calientes" de recombinación en el genoma humano y un mapa de bloques de recombinación a lo largo del mismo.

La construcción del HapMap se llevó a cabo en tres pasos: 1) identificación de SNPs en muestras de ADN de varios individuos; 2) identificación de haplotipos (SNPs adyacentes que se heredan juntos); y 3) determinación de "etiquetas de SNPs" dentro de los haplotipos que sirven para reconocerlos con gran precisión [14] (figura 5). Los resultados del HapMap constituyen una importante ventaja para llevar a cabo estudios de asociación a enfermedades comunes. Toda la información generada por el proyecto es de dominio público ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)).

## 8. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÓMICA

El estudio de haplotipos de las poblaciones nos permite conocer la distribución del desequilibrio de ligamiento a lo largo del genoma humano y cuáles son los SNPs que representan mejor cada bloque de haplotipos (tag-SNPs o SNPs etiqueta) en las diferentes poblaciones. Con esta información y utilizando tecnologías de genotipificación masiva de SNPs basadas en microarreglos, en los últimos años se han realizado exitosamente estudios de asociación alélica a lo largo de todo el genoma.



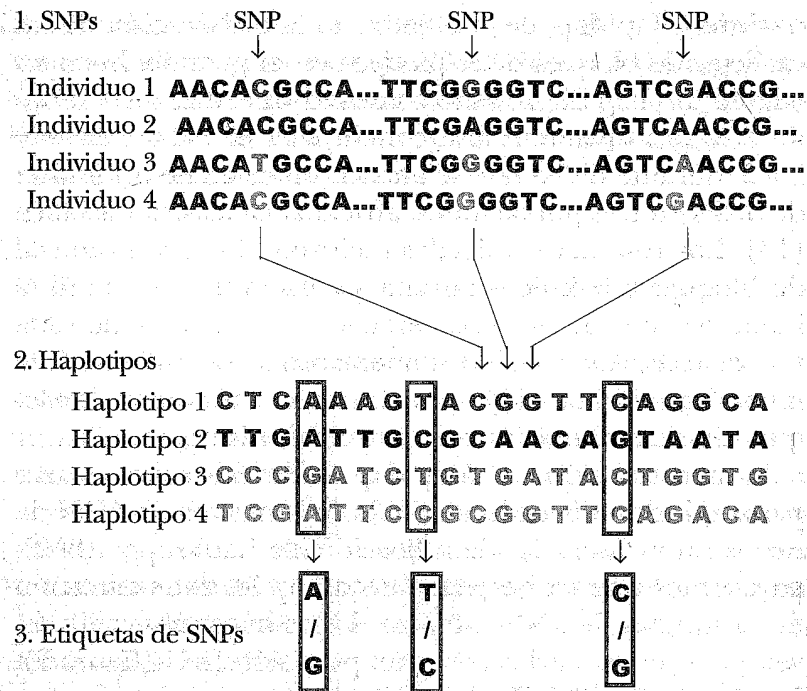


Figura 5. Generación de etiquetas de SNPs. Al identificar los SNPs de un bloque de recombinación se identifican los distintos haplotipos que se encuentran en la especie humana dentro de ese bloque de recombinación. A partir de estos haplotipos, se identifica la combinación del menor número de SNPs capaces de identificar al resto de los SNPs en cada uno de ellos.

Utilizando herramientas bioinformáticas es relativamente sencillo visualizar la posición y tamaño de los bloques de haplotipos a lo largo del genoma. La posición y tamaño de dichos bloques ayuda a seleccionar los SNPs más adecuados para cubrir todo el genoma con el menor número posible de sondas. Este trabajo previo de selección habitualmente lo hacen los fabricantes de microarreglos o chips de SNPs, quienes actualmente analizan entre 500 000 y dos millones de SNPs por microarreglo.

Para poder detectar asociaciones débiles los estudios de asociación mediante escaneo genómico requieren un gran número de muestras. Idealmente, deben utilizarse cohortes (casos y controles, por lo general) de mil individuos o más. Posteriormente, utilizando distintas herramientas, se generan los haplotipos y se buscan señales de asociación; es decir, SNPs en los que un alelo esté estadísticamente sobre-representado en los casos (individuos con el rasgo o enfermedad en estudio) respecto a los controles. Esto se hace utilizando una prueba de  $\chi^2$  o de Fisher, con corrección para pruebas múltiples.

Por ejemplo, en la figura 6 se muestra el valor de asociación (en el eje Y) para varios cientos de SNPs distribuidos por una región del genoma. En la parte central, entre las líneas verticales de puntos, se observan varios de ellos con valores de asociación que están significativamente elevados respecto a lo que sería esperable por azar. La posición de estos SNPs indica que en esa región existe uno o varios genes implicados en el desarrollo del rasgo fenotípico o enfermedad que se está analizando.

Así, en la etapa final, las regiones para las que se detectó asociación deben refinarse con un mapeo fino que requiere genotipificación de más SNPs en esa región asociada, para delimitar con mayor exactitud la región en la que se encuentra el gen y los SNPs asociados con la enfermedad en cuestión; una vez logrado esto, los resultados deben confirmarse en otras poblaciones.

Los estudios de asociación a escala genómica han generado importantes resultados recientes al identificar regiones claramente asociadas con diversas enfermedades multifactoriales [15]. En uno de estos trabajos, desarrollado por el consorcio Wellcome Trust para Casos y Controles (WTCCC), se estudiaron dos mil muestras de pacientes británicos con una de las siete enfermedades

multifactoriales más comunes (depresión, enfermedad coronaria, enfermedad de Crohn, hipertensión, artritis reumatoide y diabetes tipos 1 y 2). Estas cohortes (mil individuos en total), fueron comparadas con 3000 controles sanos y en cada uno de los 17000 individuos se genotipificaron 500000 SNPs. En conjunto, el estudio encontró una asociación significativa con varias regiones del genoma [16].

En conjunto, estos estudios han detectado regiones responsables del riesgo de padecer diversas enfermedades comunes, como la degeneración macular asociada

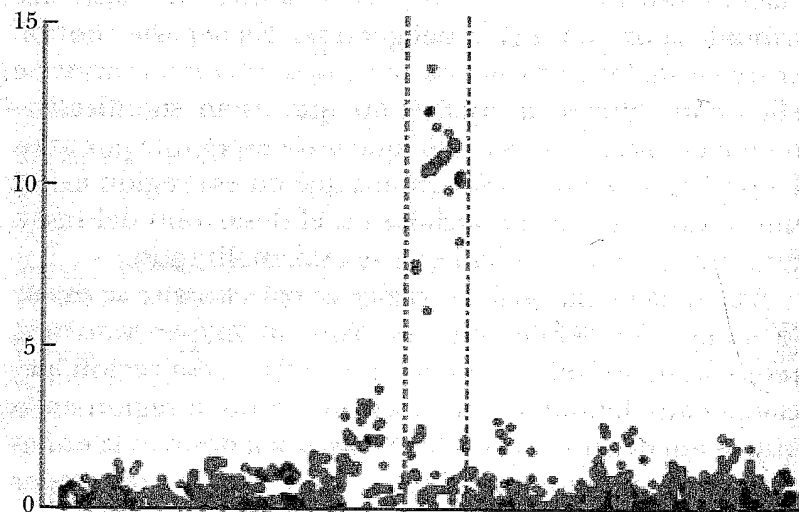


Figura 6. Resultados de un estudio de asociación genética. Se muestra el valor de asociación (en el eje Y) para varios cientos de SNPs distribuidos por una región del genoma. En la parte central, entre las líneas verticales de puntos, se observan varios SNPs (puntos rojos y negros) con valores de asociación que están significativamente elevados respecto a lo que sería esperable por azar. La posición de estos SNPs indica que en esa región existe uno o varios genes implicados en el desarrollo del rasgo fenotípico que se está analizando (una enfermedad, por ejemplo).

con la edad, el lupus eritematoso y las hiperlipidemias [15]. En los próximos años se espera que se generen muchos datos mediante este tipo de estrategias. En cualquier caso, los estudios de asociación sólo detectan variantes genéticas comunes (el alelo de menor frecuencia está presente en, al menos, el 5% de la población), por lo que su efecto sobre la enfermedad es pequeño (el riesgo de los individuos que lo portan aumenta poco en relación al riesgo general). Se acepta que deben existir otras variantes más raras (frecuencia menor al 5%) con mayor efecto fenotípico, situadas cerca de las señales de asociación. La detección de estas variantes, implicadas directamente en el desarrollo de las enfermedades, requerirá la secuenciación directa exhaustiva de muchos casos y controles.

## 9. EL PROYECTO DE LA DIVERSIDAD GENÓMICA DE LOS MEXICANOS

El perfil demográfico de México y en general de Mesoamérica tiene un origen cuyo fundamento fue el establecimiento de grupos indígenas en su territorio a lo largo de los últimos diez a doce siglos; se trata de una población relativamente joven en términos genéticos. Por otra parte, México tiene alrededor de 104 millones de habitantes. Alrededor del 6% de la población con edades de cinco años y más, hablan alguna lengua indígena, de las cuales existen más de 62, además de diversas variantes de las mismas. Esta diversidad lingüística y étnica, además de constituir una de las principales riquezas culturales de México, representa un claro ejemplo de la diversidad del origen poblacional, y por tanto genético, de los mexicanos. Actualmente, cerca del 80% de la población se

considera mestiza, con diferentes grados de ancestría indígena y europea, así como también un pequeño componente africano.

El carácter mestizo de los mexicanos se ve reflejado en la estructura genética de la población. Los genomas mestizos están conformados a manera de "mosaicos" en los que existen regiones heredadas de una de las poblaciones parentales. La ancestría de la población mexicana y sus características particulares hace que las conclusiones derivadas de estudios genéticos desarrollados en otras poblaciones no siempre puedan aplicarse a la población mestiza mexicana. Así, si bien el proyecto internacional del HapMap ofrece información muy valiosa para la investigación en medicina genómica, su diseño no incluyó a ninguna población de América Latina lo que hace cuestionable que la población mestiza mexicana pueda beneficiarse plenamente de los catálogos de haplotipos derivados por ese importante proyecto, lo que podría retrasar de manera significativa la investigación científica dirigida a la identificación de variaciones genéticas asociadas a enfermedades comunes en esas poblaciones y, con ello, generar una importante demora en el desarrollo de la medicina genómica para esta región.

Debido a lo anterior, el Instituto Nacional de Medicina Genómica de México (INMEGEN) inició un proyecto bajo principios similares a los del proyecto internacional del HapMap, con el interés de generar información genómica de la población mexicana que apoye a la investigación científica nacional y regional en medicina genómica [17]. Se espera que los resultados del proyecto ofrezcan una plataforma para acelerar el descubrimiento de variaciones genómicas asociadas a enfermedades comunes y la respuesta de la población mexicana a diferentes fármacos. Además, la información genómica de distintas zonas

del país contribuirá al estudio histórico y antropológico de los mexicanos.

Una vez aprobado por las Comisiones de Investigación, Ética y Bioseguridad del INMEGEN y con financiamiento del propio Instituto, el proyecto de diversidad genómica y el mapa de haplotipos de la población mexicana dio inicio formalmente en junio de 2005. A la fecha ha generado información sobre la estructura genómica en una muestra de mestizos mexicanos, en particular sobre la diversidad y variabilidad genómica representada por un mapa de haplotipos, por lo en este sentido, está muy cercano en motivación y alcances al proyecto internacional del HapMap.

Además de generar una plataforma que sirva de base para estudios dirigidos a la identificación de los genes cuyas variaciones confieren la susceptibilidad a enfermedades comunes, los resultados contribuirán sustancialmente a la generación de recursos humanos e infraestructura altamente especializada en el área para hacer posible un análisis inicial sobre el grado de la diversidad genómica que pueda existir entre mestizos de diferentes regiones de México. Este último objetivo resultará de gran importancia para el desarrollo de una plataforma nacional en medicina genómica.

La comparación de la estructura genética de los mestizos mexicanos con aquellas estudiadas por el proyecto internacional del HapMap será de utilidad al orientar los esfuerzos en aquellas áreas de divergencia que requieran mayor grado de resolución, a diferencia de otras regiones en que las similitudes permitan aplicar a la población mestiza mexicana los hallazgos de aplicación clínica identificados en otras poblaciones. Es decir, analizando en qué regiones del genoma somos similares a determinada población, podremos utilizar los conocimientos de genética

molecular humana y medicina genómica desarrolladas en estas poblaciones para padecimientos en ellas presentes y asociados a sus regiones; mientras que el análisis de las regiones génicas en las que nuestra población es diferente hará posible reorientar los estudios específicos para desarrollar una medicina particularmente enfocada hacia la población mexicana [17,18].

Los estados de la República Mexicana donde se llevó a cabo el muestreo incluyeron el norte (Sonora), centro (Guanajuato, Zacatecas), sur (Yucatán), las costas del Golfo (Veracruz) y Pacífico (Guerrero). Adicionalmente, con la finalidad de llevar a cabo un análisis más profundo de los componentes genéticos que podrían estar influenciados por diferencias en los perfiles de mestizaje, se incluyó una población amerindia del estado de Oaxaca (zapotecos).

En total se analizaron 300 muestras de individuos mestizos y 33 muestras de indígenas con una plataforma de microarreglos, lo que permitió obtener los genotipos de ~100000 SNPs en cada uno de los individuos participantes, los cuales se compararon con la misma información generada por el proyecto internacional del mapa de haplotipos en poblaciones del norte de Europa, el este de Asia y África.

Una vez obtenidos los genotipos se procedió a definir los haplotipos y a seleccionar aquellos que juegan el papel de etiquetas de SNPs, para lo cual se emplearon estimadores estadísticos de asociación de SNPs, tales como  $D'$  y  $r^2$ , y se desarrollaron los análisis de los datos correspondientes.

Entre los resultados más relevantes de este análisis podemos mencionar que el proyecto identificó un alto grado de heterogeneidad genómica en las diferentes regiones geográficas incluidas en el estudio. Estas dife-

rencias están determinadas en gran medida por el grado de componentes ancestrales europeos y amerindios en las poblaciones mestizas, siendo Sonora el estado con mayor porcentaje de componente europeo (61%) y Guerrero el de menor porcentaje de este mismo componente (12%). En promedio, los porcentajes de componentes ancestrales en las muestras analizadas son 55% para el componente amerindio, 41% para el europeo, 2% para el africano y 1% para el asiático [19].

Las diferencias genéticas entre poblaciones mestizas, medidas a través del método estadístico  $F_{st}$  (que mide la divergencia genética entre dos poblaciones basándose en el análisis de polimorfismos genéticos), son considerables. Por ejemplo, el valor de  $F_{st}$  (que en dos poblaciones iguales debe ser cercano a 1) entre las poblaciones china y japonesa analizadas por el proyecto HapMap es de 0.7, mientras que este mismo valor entre las poblaciones mestizas de Guerrero y Sonora es de 1.9.

De hecho, el valor de  $F_{st}$  entre la población amerindia analizada (zapotecos) y la población mestiza de Sonora, es mayor que la que se obtiene comparando a los mestizos de Sonora con las poblaciones no africanas del HapMap, por ejemplo: Sonora-zapotecas (8.2), Sonora-japoneses (7.4), Sonora-chinos (7.3), Sonora-europeos (2). Estos datos demuestran que una de las principales fuentes de la diversidad genómica en poblaciones mestizas mexicanas se deriva de los diferentes grados de componentes ancestrales presentes en cada población y que estos componentes se ven influenciados por diferencias en los perfiles demográficos y de mestizaje en cada una de las regiones del país que se analizaron [19].

Así mismo, el estudio indica que únicamente combinando la información derivada de las cuatro poblaciones analizadas por el proyecto internacional del mapa de

haplotipos se alcanza a cubrir el 96% de la diversidad de los mestizos mexicanos, lo que implica que existe diversidad genómica en la población mestiza de nuestro país que no ha sido capturada por los esfuerzos internacionales y que se deriva del componente ancestral amerindio, ya que los análisis de la muestra zapoteca permitieron identificar algunos polimorfismos que sólo están presentes en esta población amerindia y en los grupos mestizos, sin que se encuentre en otra de las poblaciones del mundo analizadas [19].

Los resultados de este proyecto indican que la elaboración de un mapa de haplotipos de la población mestiza de México mejorará la selección de SNPs etiqueta, para cubrir las variaciones genéticas comunes en los estudios de asociación a enfermedades frecuentes en la población mexicana. Este es el primer esfuerzo de genotipificación del genoma completo de una población de reciente mezcla en América Latina que se encuentra disponible públicamente (<http://diversity.inmegen.gob.mx>).

#### 10. TECNOLOGÍAS GENÓMICAS PARA EL ANÁLISIS DEL GENOMA HUMANO

Las tecnologías que actualmente existen para el estudio del genoma humano son diversas; cada vez más sofisticadas y más poderosas por la gran cantidad de información que arrojan en poco tiempo. El análisis genómico para el desarrollo del conocimiento de utilidad médica emplea diversas tecnologías de laboratorio y bioinformática. A continuación se describen dos de ellas, que han revolucionado la forma en cómo se analiza el genoma humano. Ambas son las más empleadas en el descubrimiento de variaciones genómicas asociadas a enfermedades comunes.

El escaneo del genoma humano mediante la técnica de microarreglos o chips en los cuales se estudian de 100 000 a dos millones de SNPs simultáneamente, fue empleado para el desarrollo del HapMap, así como en el desarrollo del proyecto de diversidad genómica de los mexicanos [20]. Esta técnica consiste en la identificación de múltiples SNPs a lo largo de todo el genoma humano, tanto para la construcción de haplotipos, como para la identificación de genes asociados a enfermedades comunes.

La segunda técnica se refiere a la secuenciación directa del genoma humano y ha sido empleada exitosamente durante décadas. Esta técnica tiene como objetivo la lectura de secuencias del genoma humano que pueden identificar SNPs, así como también producir lecturas genómicas que pueden empalmarse para integrar la lectura de un gen o del genoma humano completo.

El diseño y utilización de estas tecnologías requieren del conocimiento de los principios físicos y químicos de los ácidos nucleicos, a fin de poder integrar reacciones químicas que permitan obtener la información deseada para lograr objetivos como el análisis genómico de una población o la identificación de genes asociados a enfermedades comunes.

#### 11. ANÁLISIS MASIVO DE SNPs MEDIANTE MICROARRREGLOS O CHIPS GENÓMICOS

El análisis de SNPs mediante microarreglos tiene como principio la alta especificidad de la complementariedad entre las dos hebras del genoma humano. Así, con el uso de esta herramienta el genoma humano se fragmenta, se marca con fluorescencia y se hibrida en una pequeña cámara que contiene una cuadrícula en la cual se han

sintetizado previamente fragmentos de ADN de cerca de 25 nucleótidos con secuencias específicas. Por ejemplo, en una posición de la cuadrícula se ubica una secuencia con una de las dos versiones de un SNP dentro de la secuencia, digamos una G, mientras que en otra posición de la cuadrícula, se ubica una secuencia idéntica pero con la otra versión del SNP, digamos la A. Así, cuando se ponen en contacto los fragmentos del genoma a estudiar, con las miles de secuencias impresas en la cuadrícula que conforma el chip, éstas se hibridan en forma específica, de tal forma que, después de los lavados correspondientes y la lectura de la fluorescencia mediante un escáner, la computadora puede identificar cuáles posiciones de la cuadrícula contienen la señal luminosa de la fluorescencia y cuáles no. Este método permite la lectura de cientos de miles de SNPs en forma simultánea, para la construcción de haplotipos o la identificación de regiones de asociación a enfermedades, entre otras utilidades.

La hibridación de ADN en solución dentro de un arreglo de sondas de ADN inmovilizadas en una superficie en sitios microscópicos es una de las técnicas analíticas más importantes en la genómica contemporánea. Sin embargo, para que esta técnica se lleve al cabo de la mejor manera es necesario considerar parámetros que aseguren la optimización de la tasa global de captura o hibridación global del chip. Entre estos parámetros se encuentra el cálculo de la densidad óptima de sondas en la superficie, el tamaño de las sondas y los blancos y la inespecificidad tolerada, entre otros.

La definición adecuada de estos parámetros requiere considerar detalladamente los principios del proceso de hibridación, desde el punto de vista fisicoquímico. En el caso de estos chips existen dos diferentes mecanismos a través de los cuales los blancos pueden hibridarse con

las sondas complementarias: la hibridación directa desde la solución y la hibridación a través de moléculas que adsorben de manera no específica.

Los resultados experimentales indican que, para optimizar la hibridación heterogénea, las moléculas blanco en fase soluble deben tener tamaños de cien bases o menos, a fin de acelerar la migración desde la solución hacia la superficie (en el caso de los chips utilizados en el proyecto de diversidad genómica de los mexicanos, las sondas tienen un tamaño de 25 nucleótidos) (figura 7).

Este proceso requiere de condiciones que favorezcan la adsorción reversible y la difusión. Por otra parte, se



Figura 7. Microarreglos de Affymetrix. La figura muestra un microarreglo para la identificación de cientos de miles de SNPs. El dispositivo es de plástico, desechable y requiere de dos a tres días para el procesamiento completo de cada muestra.

recomienda tener una superficie que no esté excesivamente cubierta por sondas, de tal forma que se genere un impedimento estérico o hibridación no específica [21]. Este diseño experimental considera que la superficie tiene ligados de manera covalente un número fijo de moléculas que son sondas de ADN, uniformemente espaciadas y expuestas al mismo ambiente químico. Cada una de estas sondas de ADN reaccionará de manera irreversible sólo con uno de los blancos de ADN complementarios en la solución. Finalmente para asegurar hibridación específica se buscará que la cobertura superficial de blancos de ADN no adsorbidos se encuentre muy por debajo de una monocapa, a fin de que las interacciones laterales entre las moléculas adsorbidas puedan ser despreciadas.

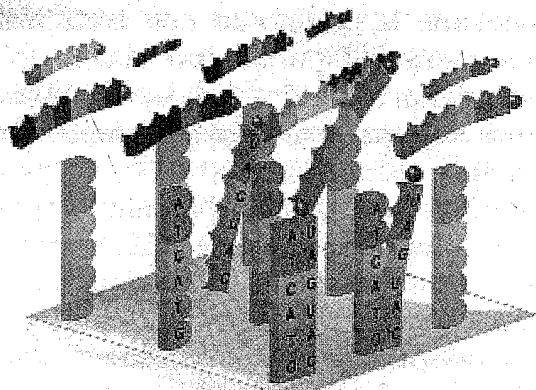
La complejidad de estas muestras se reduce todavía más mediante la optimización de las condiciones de amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual amplificará, de forma preferencial, fragmentos de 250 a 2000 nucleótidos que, una vez amplificados a un tamaño específico, serán fragmentados nuevamente, marcados con fluorescencia e hibridados sobre los microarreglos. La intensidad de la señal fluorescente es analizada para determinar el genotipo presente en la muestra para ese polimorfismo en particular.

El proceso de inmovilización de ADN de hebra simple (ssDNA) resulta crucial en la física del funcionamiento de estos microarreglos al permitir que la hibridación y la detección ocurran. El proceso automatizado mediante el cual se fijan o imprimen las vastas matrices de oligonucleótidos en un chip de genotipificación se conoce como litografía suave. En la superficie de cada chip, miles de pequeñas secuencias de ssDNA sintético son inmovilizadas. El ADN de una muestra es desnaturalizado y eti-

quetado mediante la unión con una molécula fluorescente. Esta muestra se deposita sobre el chip, lo que permite el inicio del proceso de hibridación de las secuencias conocidas, con sus secuencias complementarias en el chip (figura 8).

La hibridación es el proceso bioquímico por el cual dos moléculas complementarias de ácido nucleico de una sola hebra se combinan para formar una molécula de doble hebra. Bajo condiciones normales de estabilidad térmica, los nucleótidos se unen de manera complementaria. Para lograr este proceso, el ADN de doble hebra es calentado en una solución con pH amortiguado. Debido al choque térmico, las uniones de puentes de hidrógeno se ven desfavorecidas termodinámicamente y las hebras complementarias originales se separan. Con lo cual se obtienen las hebras de ssDNA que se hibridan sobre el chip.

La fluorescencia es una forma de luminiscencia, esto es, la emisión de luz que requiere del flujo de energía externa al sistema en la forma de absorción de irradiación. Una molécula absorbe energía y va a un estado electrónico excitado, entonces pierde energía de manera no-radiativa y desciende hasta el menor nivel vibracional del estado molecular excitado. Las moléculas que la rodean pueden ser incapaces de aceptar la gran diferencia de energía que requiere ser transferida a fin de que el electrón retorne a su estado basal. Así, la energía remanente es emitida como radiación, en forma de fluorescencia. El proceso de marcaje por fluorescencia está basado en las propiedades fisicoquímicas de un grupo de moléculas denominadas fluoróforos que son largas moléculas exógenas grandes que tienen propiedades espectrales únicas que las hacen fácilmente identificables, por lo cual resultan eficaces medios de contraste o marcaje.



Al iluminar con el láser el Genechip<sup>®</sup>, brillan los fragmentos de DNA hibridados.

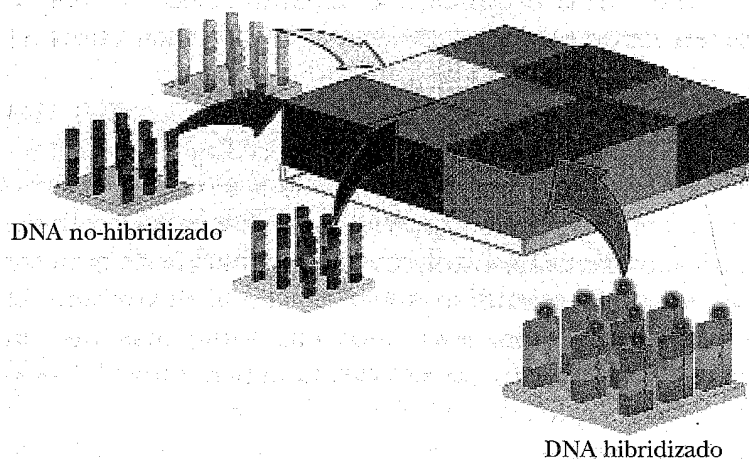


Figura 8. El panel superior muestra la disposición en cuadrícula de pequeñas secuencias de ADN, con las dos variaciones de un SNP ubicados en sitios específicos dentro de la cámara de hibridación en la parte central del microarreglo. El inferior muestra el proceso de hibridación entre el ADN fragmentado y marcado con fluoróforos del individuo que se requiere analizar. La imagen muestra cómo algunas posiciones dentro de la cuadrícula emiten fluorescencia y otras no, lo que indica la identificación de SNPs específicos en la muestra que se analiza. Derechos reservados ©INMEGEN, México.

Los fluoróforos absorben energía en longitudes de onda específicas, las que los caracterizan. Una pequeña cantidad de la energía que absorbe el fluoróforo se pierde como calor, mientras que el resto es cedido rápidamente por el fluoróforo, al remitir la energía como luz de una longitud de onda ligeramente más grande, es decir, de menor energía. Los fluoróforos pueden unirse covalentemente a una gran variedad de moléculas biológicamente relevantes tales como lípidos, componentes de membrana, proteínas, enzimas, anticuerpos y, por supuesto, ácidos nucleicos como el ADN y el ARN.

La integración de señales requiere de diversos algoritmos empleados por la bioinformática para la integración de los datos que arroja el experimento, de tal forma que pueda integrar combinaciones para la elaboración de mapas de haplotipos, o bien identificar qué variaciones genómicas se encuentran asociadas a la presencia de alguna enfermedad.

## 12. SECUENCIACIÓN DE ADN

El análisis más detallado de la estructura del ADN consiste en conocer la secuencia de nucleótidos de una región específica del genoma. Actualmente los métodos más utilizados incluyen la secuenciación automática, cuya base fundamental la constituye el método enzimático de terminación de cadena de Sanger, también conocido por el método dideoxi [22].

El método enzimático de terminación de cadena o método dideoxi de Sanger requiere de los siguientes elementos:



- 1) *El ADN molde o segmento que se desea secuenciar.* Para poder secuenciar un segmento de ADN, previamente se necesita tener una cantidad importante de ese fragmento, y por tanto, hay que aislarlo o clonarlo en un vector apropiado. Además, debe estar en estado de hebra sencilla (ssDNA).
  - 2) *Una enzima que replique al ADN.* Normalmente se utiliza la ADN polimerasa I, que sigue las reglas de complementariedad de las bases nitrogenadas y va añadiendo nucleótidos a partir de una secuencia o sonda inicial conocida como *primer*, con base en el ADN molde que se desea secuenciar.
  - 3) *Un primer*, que suele ser un oligonucleótido corto de alrededor de 20 bases de longitud, necesario para que la ADN polimerasa I comience a añadir los nucleótidos complementarios por el extremo 3' OH. Este *primer* debe tener una secuencia de bases complementaria a la del fragmento de ADN que se desea secuenciar.
  - 4) *Los cuatro nucleótidos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP y dTTP.* Algunas veces en lugar de marcar radiactivamente al *primer*, se marca radiactivamente uno de los cuatro nucleótidos trifosfato en cada reacción.
  - 5) Por último, se requieren *nucleótidos dideoxi: ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP.* Los nucleótidos dideoxi son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos pueden incorporarse a la cadena de ADN naciente, pero no es posible que se una a ellos ningún otro nucleótido por el extremo 3'. Por tanto, una vez incorporado un nucleótido dideoxi se termina la reacción de síntesis de la cadena de ADN.
- Actualmente la secuenciación genómica se lleva a cabo en forma automática. La principal diferencia entre el

método enzimático de terminación de cadena y el método automático de secuenciación se encuentra, principalmente, en el tipo de marcaje. En el método automático en lugar de radioactividad se utiliza fluorescencia y lo habitual es realizar cuatro mezclas de reacción, cada una con nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo o color distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que sea posible leer al mismo tiempo los ADNs de la nueva síntesis, producto de las cuatro mezclas de reacción (figura 9).

La segunda diferencia radica en el sistema de detección de los fragmentos de ADN. La detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que los fragmentos de ADN de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel, permitiendo con este sistema aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis y, por consiguiente, en cada secuenciación.

### 13. CONCLUSIONES

El conocimiento del genoma humano ha dado lugar al inicio de una revolución científica y tecnológica con importantes implicaciones para las sociedades contemporáneas. El estudio de las variaciones en el genoma humano avanza a pasos agigantados, lo que pronostica que en algunos años el análisis de las variaciones genómicas será parte de la cotidianidad.

Por otra parte, el gran avance en el descubrimiento de las bases genéticas de las enfermedades más comunes permitirá desarrollar nuevas estrategias para la identificación de individuos de mayor y menor riesgo a con-

traerlas, a fin de desarrollar políticas públicas que beneficien la calidad de vida, la salud, la economía y la mejor toma de decisiones en el gasto en salud de los gobiernos.

Es claro que, para el logro de estas metas, el conocimiento de los principios físicos y químicos de los ácidos nucleicos resulta fundamental, pues constituyen la base para el desarrollo de las tecnologías genómicas que traducirán el conocimiento científico en práctica rutinaria con importantes beneficios a la sociedad.

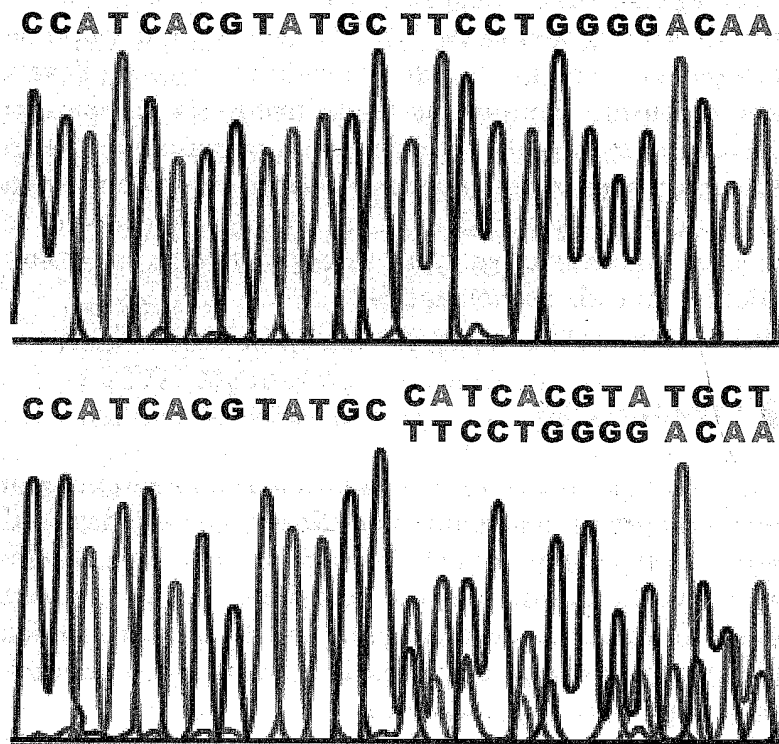


Figura 9. La figura muestra un electroferograma, producto de un secuenciador automático de uso común en los laboratorios genómicos. En él se identifica cada nucleótido con color diferente y la secuencia de la muestra en la parte superior.

## REFERENCIAS

1. Seeman N. C. y Kallenbach N. R., *Design of immobile nucleic acid junctions*, *Biophys J.* **44**, 201-9 (1983).
2. Schiessel H., Gelbart W. M. y Bruinsma R., *DNA folding: structural and mechanical properties of the two-angle model for chromatin*, *Biophys J.* **80**, 1940-56 (2001).
3. Lander E. S. et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*, *Nature* **409**, 860-921 (2001).
4. Venter J. C. et al. The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-51. (2001).
5. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*, *Nature* **431**, 931-45 (2004).
6. Seguin B., Hardy B. J., Singer P. A. y Daar A.S., *Genomics, public health and developing countries: the case of the Mexican National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN)*, *Nat. Rev. Genet.* **9** Suppl. 1, S5-9 (2008).
7. Daly M. J., Rioux J. D., Schaffner S. F., Hudson T. J. y Lander E. S., *High-resolution haplotype structure in the human genome*, *Nat. Genet.* **29**, 229-32 (2001).
8. Jeffreys A. J., Kauppi L. y Neumann R., *Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex*, *Nat. Genet.* **29**, 217-22 (2001).
9. Patil N. et al., *Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21*, *Science* **294**, 1719-23 (2001).
10. Wilson J. F. et al., *Population genetic structure of variable drug response*. *Nat Genet* **29**, 265-9. (2001).
11. Taylor J. G., Choi E. H., Foster C. B. y Chanock S. J., *Using genetic variation to study human disease*, *Trends Mol. Med.* **7**, 507-12 (2001).
12. Gabriel S. B. et al., *The structure of haplotype blocks in the human genome*, *Science* **296**, 2225-9 (2002).
13. *A haplotype map of the human genome*, *Nature* **437**, 1299-320 (2005).
14. Stram D. O. et al., *Modeling and E-M estimation of haplotype-specific relative risks from genotype data for a case-control study of unrelated individuals*, *Hum. Hered.* **55**, 179-90 (2003).
15. Manolio T. A., Brooks L. D. y Collins F. S., *A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease*, *J. Clin. Invest.* **118**, 1590-605 (2008).

16. *Genome-wide association study of 14 000 cases of seven common diseases and 3 000 shared controls*, *Nature* **447**, 661-78 (2007).
17. Jimenez-Sanchez G., Silva-Zolezzi I., Hidalgo A. y March S., *Genomic medicine in Mexico: initial steps and the road ahead*, *Genome Res.* **18**, 1191-8 (2008).
18. Jimenez-Sánchez G., *Developing a platform for genomic medicine in Mexico*, *Science* **300**, 295-6 (2003).
19. Silva-Zolezzi I. et al., *The Mexican Genomic Diversity Project: Analysis of genomic variability in Mexican Mestizo populations*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, en prensa (2009).
20. Matsuzaki H. et al., *Genotyping over 10 000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays*, *Nat. Methods* **1**, 109-11 (2004).
21. Chan V., Graves D. J. y McKenzie S. E., *The biophysics of DNA hybridization with immobilized oligonucleotide probes*, *Biophys J.* **69**, 2243-55 (1995).
22. Slatko B. E., *Thermal cycle dideoxy DNA sequencing*, *Methods Mol. Biol.* **31**, 35-45 (1994).

## CAPÍTULO 6 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS

ALFREDO TORRES LARIOS,  
MARIETTA TUENA DE GÓMEZ-PUYOU  
y ARMANDO GÓMEZ-PUYOU  
*Instituto de Fisiología Celular*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

### I. INTRODUCCIÓN

Muchas veces, sin saberlo, los seres humanos nos hemos esforzado por imitar a la naturaleza. Sin embargo, ahora sabemos que las herramientas y equipos que utilizamos, los lugares que habitamos y nuestros medios de transporte emplean principios lógicos y mecánicos que la naturaleza descubrió hace muchos millones de años. La nanotecnología, un campo que en la actualidad está en plena evolución, es cosa común y corriente en muchas de las moléculas que se encuentran en el interior de los seres vivos.

A través de su historia, los hombres han tratado de utilizar y aprovechar las diferentes propiedades de los elementos que se encuentran en la Tabla Periódica para fabricar instrumentos que le sean de utilidad, pero en la inmensa mayoría de los casos su funcionalidad es mucho menor a la de las moléculas que se encuentran en el interior de sus propios organismos. Sólo para dar un ejemplo,

\* torres@ifc.unam.mx, mtuena@ifc.unam.mx, apuyou@ifc.unam.mx

las cámaras digitales que tanto nos asombran y que ciertamente son un prodigio tecnológico, no son ni de cerca equiparables a las capacidades del ojo humano. Con una cantidad mucho más limitada de elementos químicos (básicamente C, H, O, N, S, y P, y algunos metales), los seres vivos realizan trabajos mucho más complejos y con mayor eficiencia que casi todos los instrumentos o máquinas hechas por el hombre.

Los ejecutores de estas hazañas son unas moléculas que genéricamente se conocen como proteínas. Pero antes de entrar a describir su función y estructura es necesario recordar que los archivos que distinguen a los seres vivos están en su ADN. En esencia, esta gran molécula indica cuáles son las proteínas que la célula va a fabricar. Si un organismo viviente se comparara a una casa y todo lo que usualmente se encuentra dentro de ella, las proteínas serían el equivalente de las paredes, tubería, muebles, vidrios, tostador, refrigerador, reloj y todo lo demás, pero a diferencia de una casa habitación y sus componentes, los seres vivos son animados y se reproducen. Para realizar sus innumerables funciones, las proteínas en el curso de procesos evolutivos han adoptado una gran variedad de formas, tamaños y tienen un propiedad muy importante: son estructuras extremadamente plásticas.

Una de las preguntas que por muchos años ha inquietado a los investigadores es cómo las proteínas pueden llevar a cabo todas las funciones que operan en los seres vivos. Es sorprendente, pero todas las proteínas están formadas por sólo veinte diferentes tipos de aminoácidos. Para entender cómo con estos tipos de aminoácidos se pueden formar miles de proteínas diferentes conviene recordar que con sólo siete notas musicales se pueden crear infinidad de combinaciones melódicas, o al hecho de que con veintinueve letras del alfabeto se pueden for-

mar muchos miles de palabras. Todos los seres vivos emplean los mismos veinte aminoácidos para crear proteínas que, en muchos casos, son parecidas entre sí pero, en otros muchos, se crean combinaciones e interacciones únicas. De hecho, se cree que el número y tipo de interacciones entre las proteínas de un ser vivo es lo que determina su complejidad, y no el número absoluto de proteínas que contiene.

## 2. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

Las ilustraciones a color que se presentan en este capítulo corresponden a modelos moleculares; son imágenes que buscan representar a la realidad de manera didáctica. Sin embargo, estos modelos se han construido a partir de datos experimentales con los cuales es posible visualizar a la molécula de interés. Una de las técnicas que se utilizan para poder observar la estructura de las proteínas se denomina cristalografía de rayos X, la cual se describe brevemente a continuación y se ilustra de manera muy general en la figura 2.1.

El ojo humano puede ver cualquier cosa mayor de 400 nm (con ayuda de un microscopio óptico). Ése es el límite inferior de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la luz visible, la única que puede excitar a las células de la retina. Esa medida corresponde al tamaño de algunas bacterias. Para poder visualizar objetos más pequeños, es necesario utilizar una fuente de luz con longitudes de onda más cortas. Esa fuente de luz es proporcionada por los rayos X, los cuales se utilizan a una  $\lambda$  de alrededor de 0.1 nm (1 Å), suficiente para poder visualizar átomos a nivel individual.

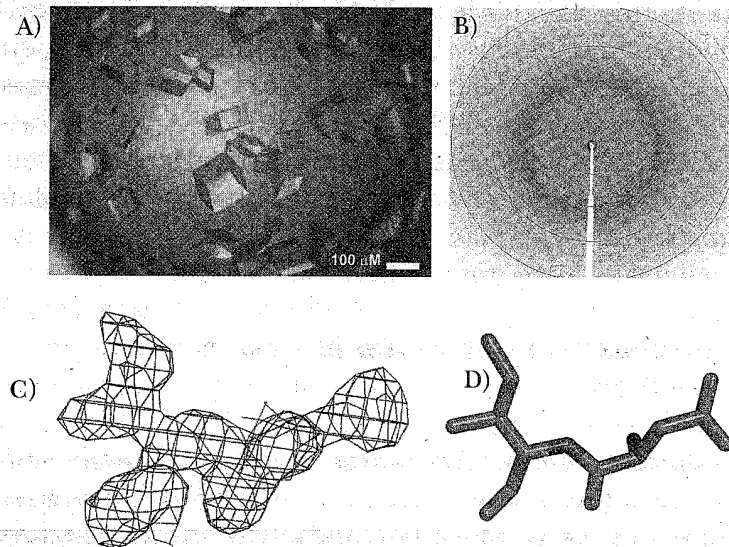


Figura 2.1. Proceso general para obtener un modelo de una estructura tridimensional por medio de cristalografía de rayos X. A) Para obtener cristales visibles al microscopio óptico se requiere partir de miligramos de proteína altamente pura. Normalmente, es necesario clonar el gen que codifica para la proteína de interés en un plásmido, el cual se introduce a una bacteria, en muchos casos *Escherichia coli*. La bacteria produce a la proteína en grandes proporciones, facilitando su purificación. Una vez purificada, la proteína se pone en contacto con soluciones deshidratantes que la concentran a un grado tal que, en cierto punto, la suspensión es lo suficientemente homogénea y se forman contactos adecuados entre las moléculas; cuando esto ocurre se forman cristales. B) Un solo cristal de proteína se coloca en una fuente de rayos X a una longitud de onda definida. El impacto del haz en el cristal se expresa como un patrón de difracción que se registra en un detector de fotones. La intensidad de cada punto contiene la información de la posición de los átomos que se encuentran en el interior del cristal. C) El tratamiento matemático de los patrones de difracción obtenidos da como resultado lo que se conoce como un mapa de densidad electrónica, el cual es el resultado experimental sobre el que tiene que validarse cualquier interpretación de la estructura. D) Basado en el mapa de densidad electrónica se construye un modelo que trata de explicar lo mejor posible las características del mismo.

Desafortunadamente, no existen lentes que puedan formar una imagen directamente a partir de la fuente de luz de rayos X. Por ello, se tiene que colectar el patrón de difracción producido por la interferencia de los rayos con el cristal y, mediante un proceso matemático conocido como transformada de Fourier, se reconstruye la imagen en una computadora.

Existe un inconveniente adicional que resulta del tamaño de las proteínas. Aunque en teoría debería de ser posible obtener la estructura tridimensional a partir de una sola molécula, la señal es tan débil que es imposible detectarla; ésta es una de las razones por las que se busca amplificar la señal utilizando millones de moléculas orientadas de la misma manera, lo que se logra a través de un cristal. Es así como de los dos procesos utilizados para visualizar entes tan pequeños se deriva el nombre de **cristalografía de rayos X**.

Para obtener un cristal es necesario un grado de pureza muy alto en sus componentes. La obtención de proteínas con esta calidad es posible utilizando mayoritariamente sistemas en los que se sobreexpresa la macromolécula de interés en bacterias. La sobreexpresión se logra introduciendo a la bacteria un plásmido que codifica en su ADN para dicha proteína. Así, diversas técnicas de biología molecular, bioquímica, biofísica e informática tienen que conjuntarse para poder producir una estructura tridimensional como resultado final.

La mayoría de la información estructural que se presenta en este capítulo se obtuvo por la técnica antes descrita. En ella se incluye una clave llamada código PDB en donde se puede acceder a los datos experimentales y al modelo tridimensional a través de la página de internet [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org). Todas las figuras que se presentan se crearon con el programa Pymol (<http://pymol.org>).

Debido a limitaciones de espacio, los modelos que se muestran en las siguientes secciones no guardan una escala proporcional entre sí; las proporciones en tamaño sólo están presentes entre las ilustraciones de una misma figura. Hay proyectos que intentan recrear los procesos animados que ocurren en la célula a partir, al menos en parte, de la información que proveen las estructuras cristalográficas. Uno de estos proyectos se encuentra en las páginas web <http://www.studiodaily.com/main/technique/tprojects/6850.html> y <http://multimedia.mcb.harvard.edu/media.html>.

### 3. FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS

A semejanza de cualquier construcción, una célula requiere un armazón que le dé forma y sostenga su estructura. En las células, el citoesqueleto está formado por proteínas como la tubulina y la espectrina. Como se muestra en la figura 3.1, estas proteínas son alargadas y se unen unas con otras formando grandes conglomerados.

Además de poseer forma, las células no son entidades estáticas. Muchas se mueven de un lugar a otro y algunos de sus organelos viajan a distintos sitios intracelulares. Las



Figura 3.1. Diversidad de estructuras y funciones de las proteínas. Estructura y soporte. La espectrina (código PDB 1U4Q) es un componente vital del citoesqueleto; proporciona flexibilidad a las células y es el sostén de varias proteínas. A menos que se indique lo contrario, en esta figura y en las subsecuentes se representan con diferentes colores a cada una de las subunidades que componen a la proteína en cuestión. Estas subunidades pueden ser muy similares entre sí, como en la presente figura, o totalmente distintas, como en la siguiente ilustración.

moléculas que llevan a cabo estas últimas funciones son por ejemplo, la actina, la miosina y la cinesina. En la figura 3.2 se muestra la miosina que tiene la tarea, junto con la actina, de alargar o acortar las fibras musculares.



Figura 3.2. Diversidad de estructuras y funciones de las proteínas. Movimiento. La miosina (código PDB 2OS8), junto con la actina, son proteínas esenciales en la relajación y contracción muscular. Con distintos colores se muestran las distintas subunidades de la miosina.

Para continuar ilustrando sus funciones, es interesante señalar que las células poseen proteínas que comunican los espacios intra y extracelulares. Las encargadas de llevar a cabo dichas funciones son proteínas membranales (figuras 3.3 y 3.4). A través de la evolución, algunas proteínas se especializaron en el transporte de iones y moléculas del exterior al interior de las células y viceversa y también en transportar moléculas entre dos compartimentos intracelulares. Es interesante notar que las mostradas en las figuras 3.3, 3.4, y 3.5 son proteínas que residen en las membranas celulares y, sin embargo, la estructura de las tres es marcadamente diferente, lo cual refleja que el transporte de distintas moléculas o iones requiere de estructuras especializadas en funciones muy particulares. Por ejemplo, en la figura 3.5 se muestra la estructura de una proteína que se encarga de transportar moléculas entre dos compartimentos intracelulares.

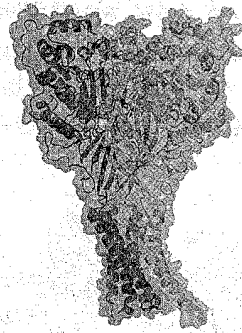


Figura 3.3. Proteínas que comunican el interior de las células con el exterior. Los canales iónicos sensores de pH detectan variaciones en la concentración de protones ( $H^+$ ) (código PDB 2QTS). Este tipo de canales se usa para percibir dolor, choque isquémico, mecanosensibilidad, aprendizaje y memoria. Las proteínas de membrana como la que se muestra en la figura participan en la comunicación celular y son un blanco importante de toxinas y diversos fármacos. Los colores indican las proteínas que al unirse forman la proteína funcional.

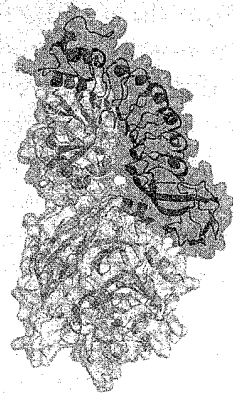


Figura 3.4. Las proteínas se unen a receptores y disparan señales. La bacteria patógena, *L. monocytogenes* produce una proteína en su superficie (en morado) que se une a un receptor en la membrana celular del hospedero (en amarillo), modificando señales que son necesarias para la supervivencia de la célula (código PDB 2UZK).



Figura 3.5. Algunas proteínas son medios de transporte. La función de las llamadas proteínas multivesiculares es transportar proteínas transmembranales y lípidos al lumen del endosoma (un compartimiento celular). ESCRT-II es uno de los complejos multiproteicos que realizan este transporte (código PDB 1U5T); las distintas proteínas que forman el complejo están marcadas con colores diferentes.

En la vida de cualquier organismo siempre hay agresiones y por tanto se requiere desarrollar mecanismos de defensa. Las proteínas defensoras son por ejemplo: los anticuerpos, interferones, el factor de necrosis tumoral y diversas toxinas. Pero es necesario mencionar que las proteínas también participan en la agresión de unos organismos a otros. En la figura 3.6 se muestra el factor letal de la bacteria *Bacillus anthracis*, un microorganismo tristemente célebre.

Finalmente, uno de los grupos más numerosos de las proteínas son las enzimas, las cuales son las responsables de catalizar la inmensa mayoría de las reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos. Dada la multitud de reacciones catalíticas que las enzimas realizan, no es de sorprender que exista una variabilidad enorme en su tamaño y complejidad. En la parte superior de la

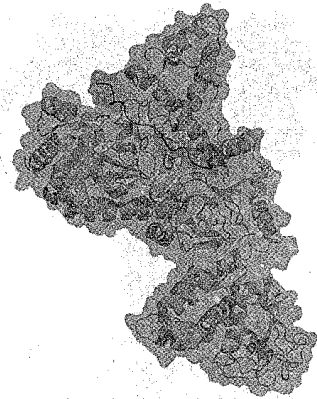


Figura 3.6. Algunas proteínas son factores letales. El llamado factor letal (en verde, código PDB 1JKY) producido por la bacteria *Bacillus anthracis* (el agente causante del ántrax) es una proteína crítica en la producción de la enfermedad. La proteína es una proteasa (enzima que corta a otras proteínas) que corta específicamente a un tipo de enzimas llamadas cinasas (un fragmento de una de ellas se presenta en rojo); estas proteínas (específicamente, las MAPK cinasas) son esenciales para regular la homeostasis en el ser humano.

figura 3.7 se muestra la estructura cristalográfica de la ribonucleasa, una de las enzimas que más se han estudiado. En la parte inferior de la figura 3.7 también se muestra la estructura de la sintasa de ácidos grasos; fácilmente se percibe que esta enzima es mucho más compleja que la ribonucleasa, y que además está formada por varias proteínas.

Con frecuencia, para manifestar sus acciones catalíticas, muchas enzimas son auxiliadas por las propiedades químicas de algunos metales, por ejemplo zinc (véase figura 3.8A); en ocasiones, para manifestar su función, las proteínas se unen a cofactores (vitaminas) como la vitamina D; este caso se ilustra en la figura 3.8B.

En el siglo pasado, se hizo evidente que los organismos viven gracias a que constantemente sus proteínas interac-

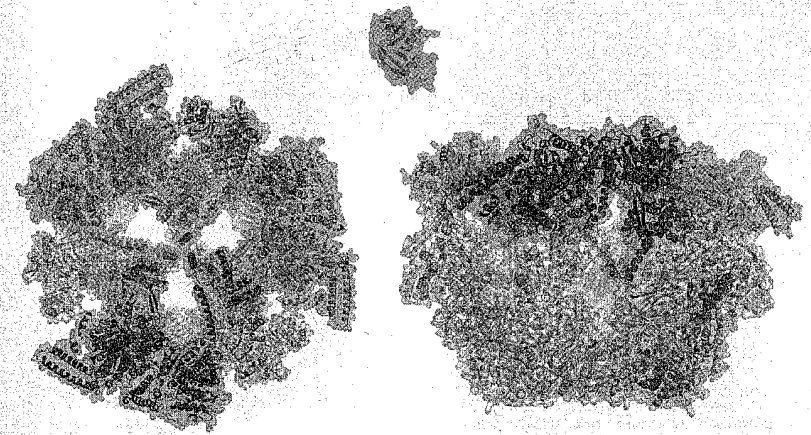


Figura 3.7. Catálisis y diferencias en las dimensiones de dos enzimas. En esta figura se trata de ilustrar los distintos tamaños y complejidad de las enzimas. En la parte superior (pequeña estructura verde) se muestra la ribonucleasa A, una enzima que degrada ARN (código PDB 5RSA). La ribonucleasa es una enzima extremadamente estable que cataliza su reacción hidrolítica a una velocidad limitada por difusión, o sea que la velocidad a que cataliza la reacción depende de la velocidad a la que entran y salen los sustratos y productos del centro activo. En la parte inferior se presentan dos vistas de la sintasa de ácidos grasos (código PDB 2UV8). La sintasa es un complejo multienzimático que cataliza todas las reacciones de la síntesis de ácidos grasos. Los colores representan las proteínas que forman este gran complejo.

túan con moléculas de distintos tamaños y características. Estas interacciones se realizan muchas veces con moléculas relativamente pequeñas, pero en muchas ocasiones con moléculas complejas como los ácidos nucleicos y con otras proteínas. En ocasiones, las interacciones entre las proteínas y otras moléculas dan lugar a la formación de complejos multimoleculares enormes. La figura 3.9 muestra dos de estos grandes complejos. El primero es el que se forma entre la cromatina y las proteínas conocidas como histonas. El otro es el ribosoma, el complejo en donde se realiza la síntesis de proteínas.



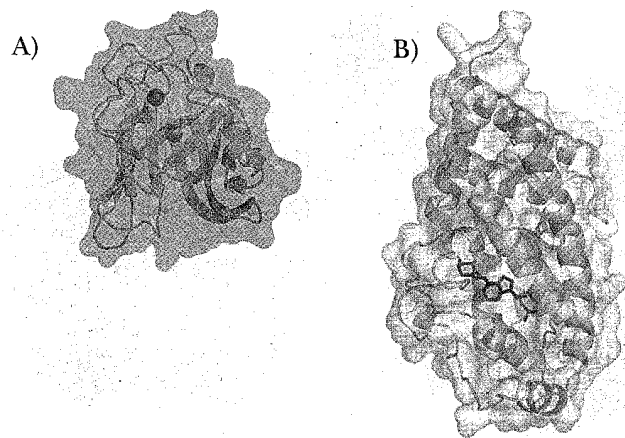


Figura 3.8. Algunas enzimas utilizan cofactores para ejercer su función. En A se muestra la enzima superóxido dismutasa (código PDB 2AQM); ésta utiliza un ion zinc (mostrado como una pequeña bola morada) y un ion cobre (esfera gris) para realizar su función catalítica. B. Receptor de la vitamina D (en rojo, código PDB 1DB1). La familia de los receptores nucleares, como el que se ejemplifica aquí, modulan la transcripción de genes en respuesta a la unión de moléculas lipofílicas pequeñas como la vitamina D.

Más adelante se discutirá con cierto detalle la estructura de algunas enzimas y cómo ésta se relaciona con su función, pero antes es importante mencionar algunas peculiaridades de las enzimas. Aunque cada enzima tiene una arquitectura única, muchas se combinan unas con otras formando arreglos estéticos que surgen de la simetría entre sus distintos componentes, por ejemplo en el proteasoma (figura 3.10). Por otro lado, también se sabe que algunas enzimas son multifuncionales, por ejemplo véase a la ARNt sintetasa en la figura 3.11.

También es importante hacer énfasis en que para realizar su función, las enzimas siguen los principios lógicos del mundo macroscópico (figuras 3.12 y 3.13). Por ejemplo, para atraer un sustrato con carga negativa, muchas enzimas

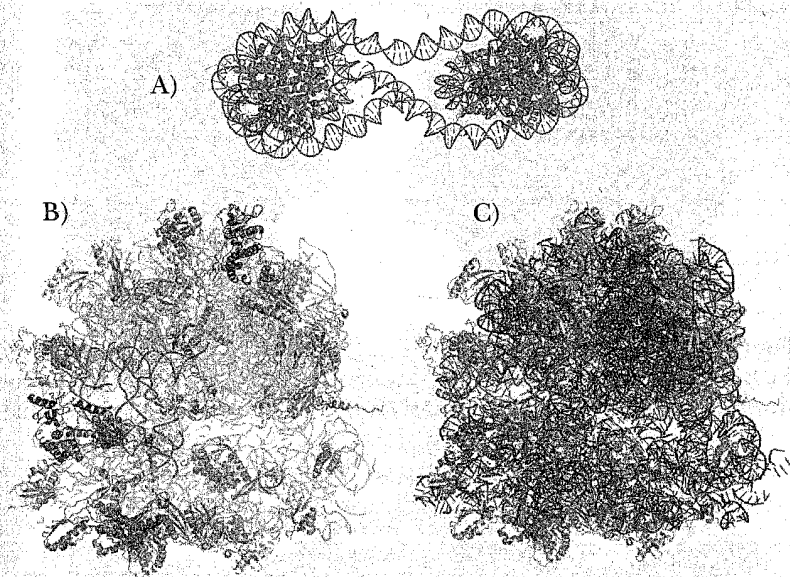


Figura 3.9. Complejos de proteínas con otros componentes celulares. En A se muestra el nucleosoma (código PDB 1ZBB), la unidad básica de la cromatina. La figura muestra un complejo ADN-proteína (en verde) cuya función principal es producir el empaquetamiento del ADN. B y C muestran la estructura tridimensional del ribosoma; es un complejo enorme de ARN y proteína que es fundamental en el proceso de traducción (códigos PDB 2J00 y 2J01). B. Las subunidades de proteína que forman parte del complejo están representadas en varios colores. En el ribosoma, la proteína tiene una función estructural no catalítica. El ribosoma es una ribozima, en donde la molécula de ARN juega un papel funcional. C. Las subunidades de ARN se muestran en rojo, y las proteínas en gris.

tienen regiones con carga negativa cuya finalidad es facilitar o dirigir el movimiento del sustrato hacia una región que tiene cargas positivas. Asimismo, en el curso de la evolución, se buscó complementaridad entre las moléculas que tienen que interactuar, y formar cavidades donde se aisle y proteja la molécula que se le une (**ligando**).

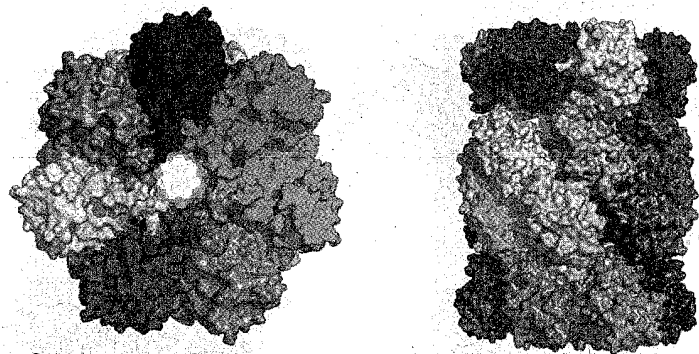


Figura 3.10. Simetría. Estructura tridimensional del proteasoma (código PDB 2FGH), complejo proteico encargado de degradar proteínas que no se han plegado correctamente. La mayoría de las proteínas forman complejos oligoméricos simétricos.

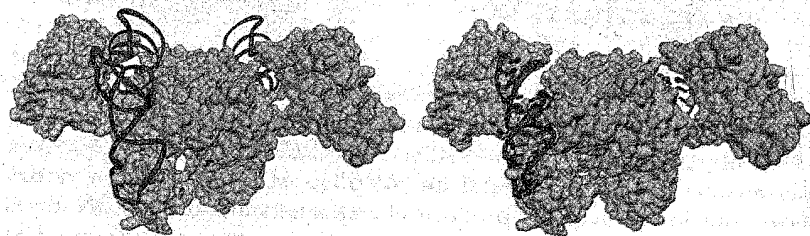


Figura 3.11. Algunas proteínas son multifuncionales. Un ejemplo muy claro es la enzima treonil ARNt sintetasa, que reconoce a su ARNt correspondiente y lo une a su aminoácido respectivo (izquierda, código PDB 1QF6). La enzima también reconoce una región que se encuentra arriba del codón de inicio de su ARN mensajero; una vez unidos se llevan a cabo mecanismos de regulación traduccional (derecha, código PDB 1KOG). Ambas moléculas de ARN son parecidas, pero no son idénticas, y su función es completamente diferente.

Estas características de las enzimas se logran gracias a la flexibilidad de las proteínas, propiedad que les permite llevar a cabo **cambios conformacionales**, los cuales a lo largo de muchos años de evolución, se han traducido en mecanismos muy precisos de regulación y señalización.

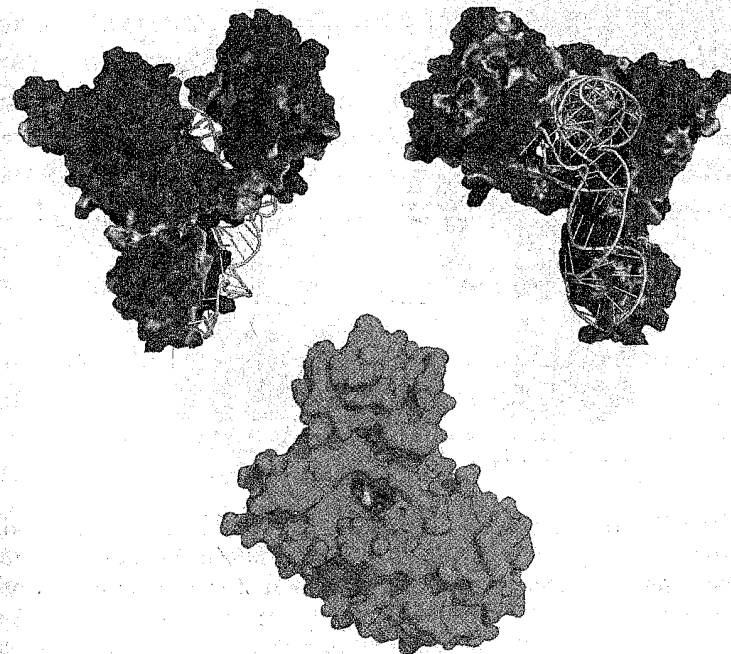


Figura 3.12. Estrategias y mecanismos de reconocimiento y señalización. Para ilustrar las distintas estrategias que las enzimas utilizan para llevar a cabo sus procesos catalíticos, mostramos dos enzimas. La primera es una ARNt sintetasa (ver las dos estructuras en la parte superior de la figura). Para colocar a su sustrato en un sitio preciso, un ARNt (indicado en amarillo) que posee muchas cargas negativas debido a sus grupos fosfato, las ARNt sintetetas poseen una región bastante extensa que posee un número muy elevado de cargas negativas (señaladas en rojo). Estas facilitan el desplazamiento del ARNt hacia la zona cargada positivamente (en azul); una vez ahí, el ARNt se coloca en una posición precisa y favorable para que ocurra la reacción catalítica (código PDB 1QF6). Figura inferior: muchas enzimas poseen cavidades que aceptan únicamente al sustrato. Pero eso no es todo, después de que ocurre la interacción entre el sustrato y la enzima, la enzima lo aísla y posteriormente lo modifica. En la enzima luciferasa (código PDB 2D1S) se llevan a cabo estos eventos. En las luciérnagas, la enzima es responsable de la emisión de la luz. La molécula de luciferina (esferas amarillas) se rompe en una reacción en la que participa el ATP. La acción de la enzima es impresionante, ya que convierte la energía del ATP en luz. En la figura se observa que la luciferina está dentro de una cavidad situada en la parte media de la proteína.

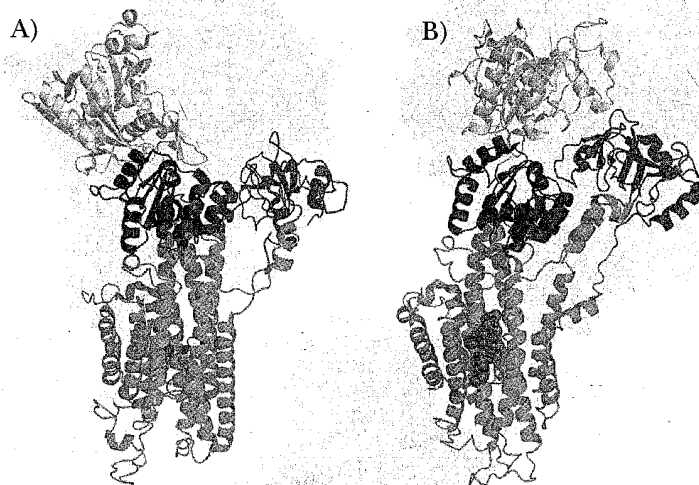


Figura 3.13. Estrategias y mecanismos de reconocimiento y señalización. Cambios conformacionales. Muchas enzimas sufren cambios conformacionales muy extensos para llevar a cabo su función. Estos cambios se ejemplifican en la bomba de calcio del músculo esquelético. En A se muestra la estructura de la enzima en presencia de calcio (esferas rojas situadas en la parte verde, código PDB 1EUL). B muestra a la enzima en presencia de un inhibidor (en magenta, código PDB 1IWO). La estructura con calcio representa la conformación abierta. La estructura con el inhibidor es una conformación cerrada en donde se interrumpe el flujo de iones. La unión del inhibidor promueve movimientos en grandes regiones de la proteína que se encuentran muy alejadas del sitio de unión del calcio o el inhibidor.

#### 4. ARQUITECTURA GENERAL DE UNA PROTEÍNA

En el curso de este capítulo se discutirá con cierto detalle la estructura y función de tres enzimas con el propósito de ilustrar lo variado de la acción enzimática y cómo se llevan a cabo distintos procesos. La descripción de las tres enzimas también se aprovechará para tratar algunos principios básicos de la estructura de las proteínas. La primera enzima que se describe se conoce en la literatura científica como triosafosfato isomerasa o de

forma abreviada, TIM (figura 4.1). El nombre de las enzimas se otorga de acuerdo al tipo de función que realizan (en este caso, una isomerización) y el sustrato que modifica, o sea una triosafosfato. Específicamente, la TIM cataliza la interconversión entre el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. La figura 4.1 muestra la estructura cristalográfica de la TIM, en donde también se ilustra su sustrato y el sitio donde se aloja.

Llama la atención que la enzima es mucho más grande que la molécula sobre la que va a actuar; de hecho, es unas 500 veces más voluminosa. Esta característica es común a muchas enzimas, y existen razones para que, en general, éstas sean moléculas grandes. Una de ellas es la estabilidad. Debido a que las interacciones fisicoquímicas que estabilizan a una proteína son en general débiles, se puede decir que, en general, entre más elevado sea el número de interacciones intramoleculares, mayor será la estabilidad de las proteínas. Otra razón es que en muchas enzimas, su estructura está hecha para dirigir los sustratos hacia el **centro activo**, o sea el sitio donde ocurren los eventos químicos de la reacción.

Otra característica de la TIM que se aprecia en la figura 4.1 es que está formada por dos entidades proteicas o **subunidades**; cada una de ellas está representada en colores diferentes; a las subunidades también se les llama **monómeros**. En el caso de la TIM, los dos monómeros son exactamente iguales; es decir, la TIM es un **homodímero**. Esa situación no es rara, de hecho, en los últimos años ha quedado claro que la gran mayoría de las proteínas forman complejos de varios monómeros idénticos (dímeros, trímeros, tetrámeros, etcétera (figura 4.2A)); también es relativamente frecuente encontrar enzimas que están formadas por subunidades diferentes (se les ha llamado: **heterodímeros**, **heterotetrámeros**, etcétera

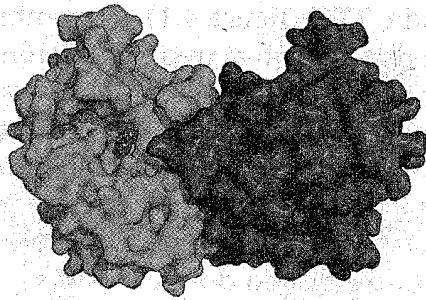


Figura 4.1. Triosafosfato isomerasa. La enzima consta de dos subunidades idénticas, es decir es un homodímero. El sustrato se muestra en color rojo en el monómero de la izquierda. La enzima tiene que existir en estado dimérico para ser activa. Parte de esa dependencia se puede entender por la gran cercanía que existe entre el sitio activo de un monómero y la otra subunidad (en morado) (código PDB 5TIM).

(figura 4.2B). El actuar en grupo y no individualmente trae consigo enormes ventajas. La más evidente es la comunicación que se puede establecer entre los distintos monómeros de la enzima, y así regular su función, por ejemplo, por medio de un proceso que en enzimología se conoce como cooperatividad. Cuando dos o más monómeros se asocian unos con otros, se dice que la proteína en su conjunto tiene una **estructura cuaternaria**.

Hasta este momento se ha dado una visión general de la estructura de varias proteínas, incluyendo a la TIM; ahora es necesario penetrar un poco más a la estructura detallada de las proteínas. Para ello analicemos uno de los dos monómeros de la TIM. En la figura 4.3, se aprecia que la representación del monómero es muy diferente a la que se ha manejado en las figuras anteriores, en donde se veía que todos los átomos de la proteína ocupaban un espacio tridimensional. En el esquema de la figura 4.3, y en muchos de los que se muestran en figuras subsiguientes, se ilustra únicamente el **esqueleto** de la proteína, que también se conoce como **cadena principal**. Así como

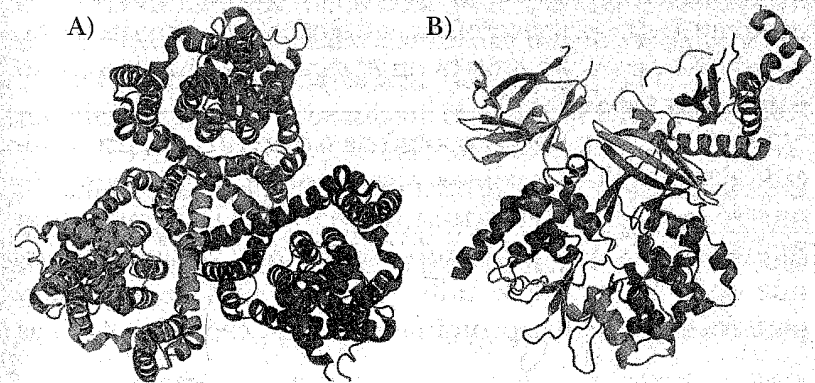


Figura 4.2. Ejemplos de oligómeros. La inmensa mayoría de las proteínas funcionan después de que forman complejos entre dos o más subunidades que pueden ser idénticas o distintas, aunque los más comunes son los homodímeros y los homotetrámeros. En la figura se presentan dos ejemplos de otro tipo de arreglos. En A se muestra un **homotrímero**, el transportador de glutamato (código PDB 2NWL). Estas moléculas son esenciales para la función y desarrollo del sistema nervioso central. En B se ilustra un **heterotrímero**. La cinasa activada por AMP (código PDB 2QLV) es un regulador central de la homeostasis en mamíferos.

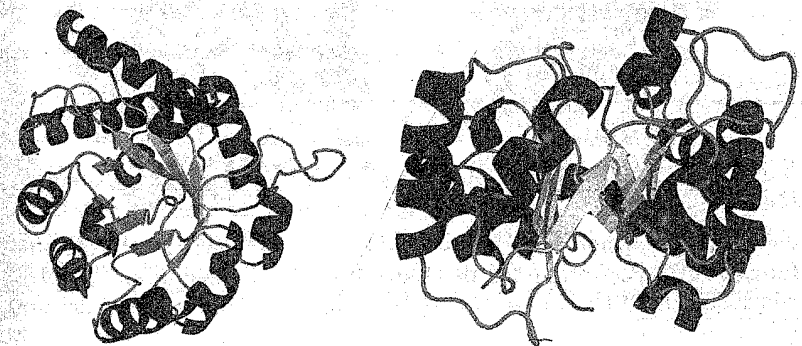


Figura 4.3. Dos vistas del esqueleto de la triosafosfato isomerasa.

el esqueleto determina la forma de un ser humano, el esqueleto de las proteínas gobierna su arquitectura. El arreglo de ese esqueleto en el espacio se conoce como **estructura terciaria**.

En el universo de las proteínas existe un número limitado de tipos de esqueletos, alrededor de 1200, a pesar de que se conoce la estructura de más de 11500 proteínas diferentes. Éste es un punto importante, ya que implica que en la evolución se utilizó un solo tipo de esqueleto para formar muchas proteínas distintas, cada una de ellas

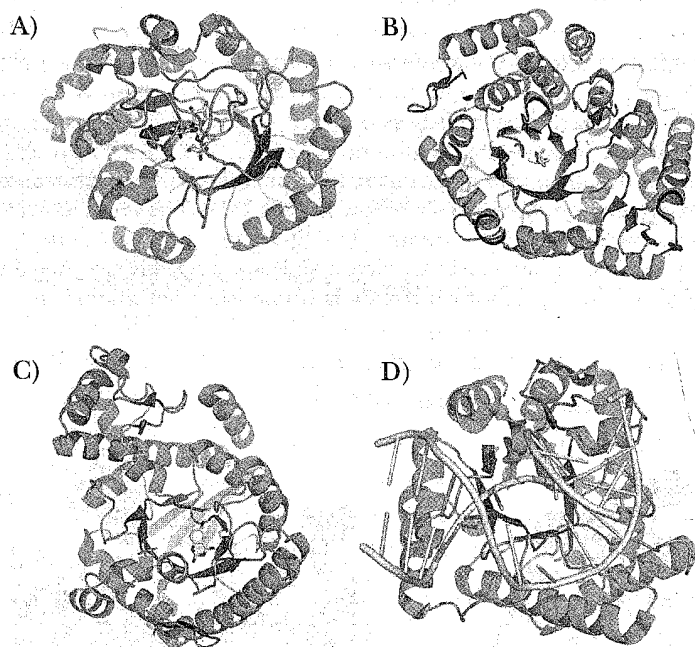


Figura 4.4. El mismo esqueleto se usa para formar enzimas con distintas funciones. Estructura global de cuatro diferentes enzimas en complejo con sustratos. El ligando en amarillo indica la posición general del sitio activo que se localiza casi en la misma posición en las cuatro enzimas. A: biotina sintasa (código PDB 1R30). B: Monometil amino metil transferasa (código PDB 1NTH). C: ARNt guanin transglicosilasa (código PDB 1R5Y). D: Enzima reparadora de ADN (código PDB 1QTW).

con una función particular. En este sentido, la estructura de la TIM es un ejemplo excelente. En la naturaleza, el esqueleto que caracteriza a la TIM se encuentra en docenas de enzimas que catalizan reacciones muy diferentes (figura 4.4). De hecho, se calcula que el 10% de todas las enzimas conocidas tienen el plegamiento que posee la TIM. La figura 4.5 muestra algunos de los distintos esqueletos que se encuentran en las proteínas.

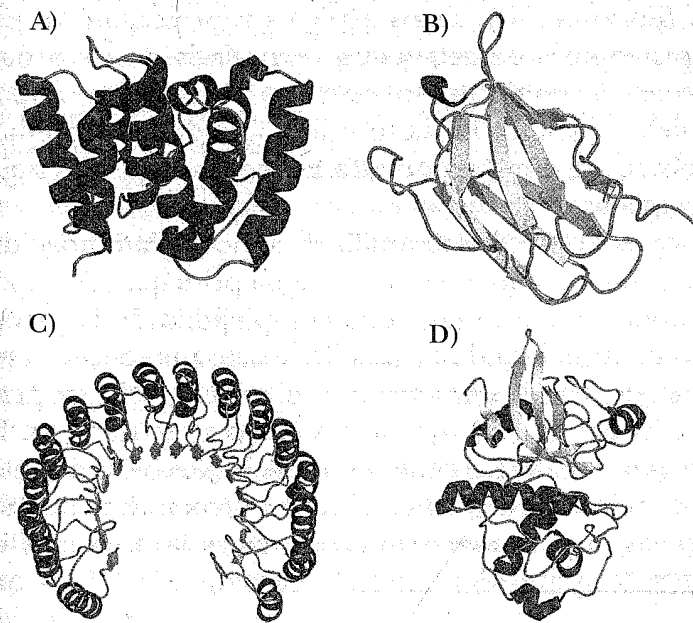


Figura 4.5. Ejemplos de diferentes tipos de esqueletos. Una de las clasificaciones estructurales de las proteínas (SCOP) comprende 11 diferentes tipos de esqueletos. En esta figura se ejemplifican cuatro de ellos. A: La totalidad de la proteína de la matriz del virus de la influenza está formada por alfa-hélices (código PDB 1AA7). B: Proteínas formadas por hojas beta. Se muestra un llamado beta-sandwich característico de las inmunoglobulinas (código PDB 1BWW). C: Proteínas alfa y beta ( $\alpha/\beta$ ). Inhibidor de ribonucleasas (código PDB 2BNH). D: Proteínas que poseen alfa-hélices y hojas beta ( $\alpha + \beta$ ); la proteína es una cisteína-proteasa (código PDB 2ACT).

Se mencionó que el esqueleto de las proteínas es la estructura que determina la forma que tiene una proteína. Por tanto, es importante describir con cierta profundidad qué se entiende por esqueleto en las proteínas y cómo los aminoácidos, los ladrillos fundamentales de las proteínas, dan lugar a dicho esqueleto. Si se examina la figura 4.3, se aprecia que en la proteína existen dos arreglos claramente distinguibles: unos son semejantes a unas espirales (en rojo) y otros parecen varillas más o menos rectas (en amarillo). Estos arreglos representan los dos tipos principales de **estructura secundaria** de las proteínas que, en su conjunto, forman una porción muy importante del esqueleto. En la terminología de las proteínas, las espirales se denominan **alfa hélices** y las varillas **hojas beta plegadas**.

Ahora es conveniente analizar cómo los aminoácidos de una proteína dan lugar a la cadena principal. Es importante notar que, a pesar de la complejidad de las proteínas, en el esqueleto de todas ellas existe un arreglo repetitivo de átomos de carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O) e hidrógeno (H) dispuestos como se muestra en las figuras 4.6 a 4.10. La repetición en la posición de estos átomos en la cadena principal de las proteínas tiene consecuencias importantes. Una de ellas es la presencia de un carbono quiral denominado carbono alfa ( $C\alpha$ ) que presenta geometría tetraédrica y que aparece periódicamente cada tres átomos de la cadena principal (figuras 4.6 y 4.10). La segunda es que entre los dobles enlaces parciales  $C=O$  y  $C=N$  existe resonancia, lo que hace que la zona que ocupan estos átomos en la cadena principal sea plana, semejante a una hoja de papel (figura 4.10). La geometría de estos arreglos implica que el movimiento de la cadena principal está restringido a un espacio en el que los planos adyacentes no chocan entre sí. La tercera

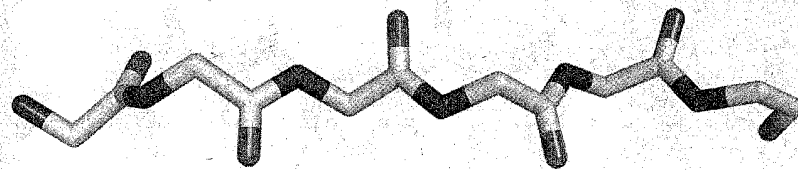


Figura 4.6. Cadena principal de una proteína. El arreglo universal entre los aminoácidos de todas las proteínas se conoce como **unión peptídica**. El arreglo se muestra en la figura; los átomos de carbono están en color amarillo, los NH en azul y los oxígenos en rojo. Como se puede ver existen dos tipos de carbono: los carbonos quirales alfa ( $C\alpha$ ) y los que junto con el oxígeno (en rojo) forman un grupo carbonilo ( $C=O$ ). En azul se encuentran los átomos de nitrógeno que representan el grupo amino (NH). Por convención, la numeración de los aminoácidos en una proteína se inicia en el extremo amino terminal (a la izquierda en la figura) y finaliza en el carboxilo terminal (a la derecha). El número de carbonos alfa (vértices amarillos unidos a los NH en azul) se utiliza para determinar el número de residuos de aminoácidos que componen a la proteína.

En la figura, el polipéptido consta de 6 residuos.

consecuencia deriva de que los grupos  $C=O$  y NH tienen cierto grado de polaridad y, por tanto, pueden interactuar entre sí por medio de **puentes de hidrógeno** (figura 4.7). Se debe enfatizar que los puentes de hidrógeno son las fuerzas estabilizadoras principales de la estructura secundaria de las proteínas (figuras 4.8 y 4.9).

Tanto las hélices alfa como las hojas betas se mantienen y se estabilizan por medio de los puentes de hidrógeno (figura 4.7). Las alfa hélices se forman como consecuencia de interacciones intramoleculares de corta distancia entre grupos químicos de la misma cadena principal. Las hojas beta se forman cuando una parte de la cadena interactúa con otra porción de la cadena de aminoácidos (figuras 4.8 y 4.9). Estos arreglos confieren propiedades particulares a las proteínas. Las hélices son estables por sí mismas y, por otro lado, nunca se encontrará una hebra beta plegada independiente.

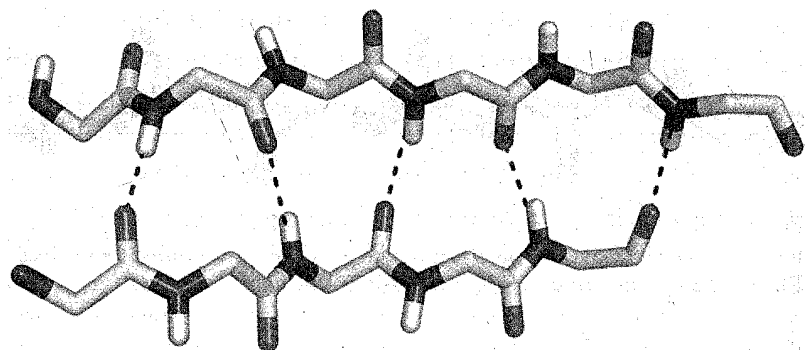


Figura 4.7. Puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno son interacciones polares y son las principales fuerzas que estabilizan las estructuras secundarias (alfa hélices y hojas beta plegadas) en las proteínas. Por sí solas son interacciones débiles; es el conjunto de ellas lo que provee su fortaleza. En la figura, los átomos de hidrógeno se muestran en blanco, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo y carbono en amarillo. Las interacciones tipo puente de hidrógeno se muestran con líneas punteadas. Los puentes de hidrógeno se establecen a distancias que varían entre 2.4 y 3.5 Å (1 Å = 0.1 nm).

La conexión entre las hojas beta y las alfa hélices de la estructura secundaria se realiza a través de **vueltas** (también se les llama **giros**, **rizos** o **asas**) que pueden estar constituidos por dos o más residuos. El aminoácido glicina, debido a su flexibilidad, y la prolina por sus restricciones en sus ángulos de torsión, se encuentran comúnmente en dichos giros.

También es importante señalar que los carbonos alfa de la cadena principal están unidos a un grupo amino (NH), un grupo carbonilo (C=O), un átomo de hidrógeno (H) y un radical (R) conocido también como cadena lateral (figura 4.11). Existen 20 tipos posibles de cadenas laterales divididos básicamente en tres grupos diferentes: polares, cargados e hidrofóbicos (figuras 4.12 a 4.14). La dirección que tienen estos grupos cuando se proyectan de la cadena principal y sus interacciones con otras cadenas

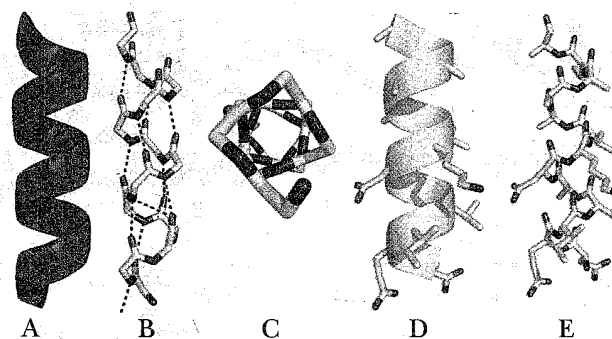


Figura 4.8. Estructura secundaria. Las alfa hélices. A Se acostumbra representar a las alfa hélices como cilindros helicoidales. La necesidad de satisfacer las diferentes polaridades de la cadena principal del esqueleto de una proteína es la fuerza que promueve la formación de alfa hélices o de hojas beta plegadas (ver siguiente figura). En los dos tipos de estructuras, los puentes de hidrógeno (líneas punteadas) juegan un papel preponderante; son interacciones polares que se establecen entre los grupos amino (en azul) que tienen una carga parcialmente positiva y los carbonilo (en rojo) cuya carga es parcialmente negativa. B muestra el arreglo de los puentes en las alfa hélices. C, muestra a la alfa hélice vista desde uno de los extremos. Las cadenas laterales de los 20 diferentes aminoácidos de la proteína no contribuyen directamente a la estabilidad de la hélice, ya que se proyectan fuera de la estructura helicoidal. D muestra una proyección de la hélice representada como un cilindro y con las cadenas laterales proyectándose hacia el extremo amino terminal (hacia abajo). E muestra la proyección de las cadenas laterales en el esqueleto de la hélice. Las cadenas laterales de algunos aminoácidos ocasionan impedimentos estéricos o de espacio que favorecen que unos aminoácidos sean más comunes que otros en la formación de las hélices. La prolina es un aminoácido que no suele encontrarse formando parte de hélices (ver más adelante).

laterales o con el medio que rodea a la proteína (generalmente agua) es lo que en última instancia determina la estructura tridimensional de las proteínas.

Aunque las proteínas son moléculas muy complejas que por lo general están constituidas por cientos y a veces miles de aminoácidos, la adquisición de su estructura

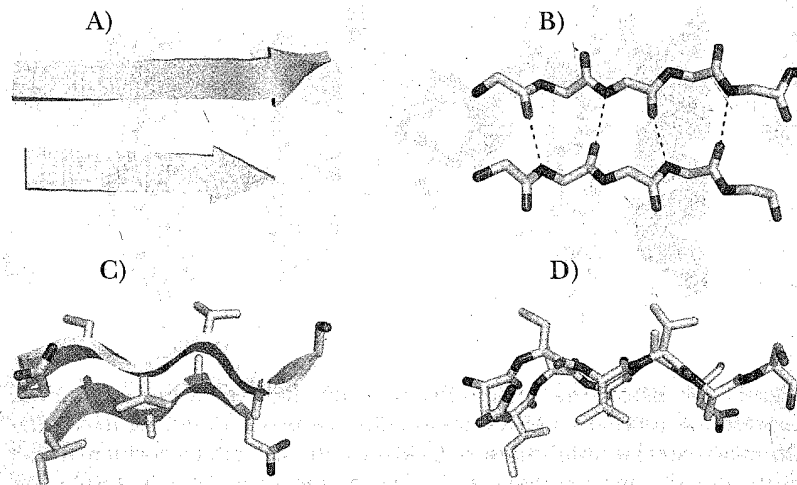


Figura 4.9. Estructura secundaria. Las hojas beta plegadas. Se acostumbra representar a las hojas beta como flechas gruesas (A y C). En las hojas beta del esqueleto de una proteína, las cadenas laterales de los aminoácidos están dispuestas en forma de zigzag a lo largo de la cadena principal (C y D). Se forman también puentes de hidrógeno con los mismos grupos que dan lugar a las alfa-hélices, excepto que los puentes de hidrógeno se establecen entre los grupos carbonilo y amino de cadenas contiguas (B). Las hojas beta pueden ser paralelas o antiparalelas, dependiendo de la dirección de la cadena (por convención, las flechas van del extremo amino terminal al carboxilo terminal). Los paneles inferiores se rotaron  $90^\circ$  con respecto a los superiores.

secundaria, terciaria y cuaternaria sigue reglas muy simples de la química y la física. La estructura secundaria únicamente puede tener dos conformaciones; esto deriva del principio de que los grupos polares de la cadena principal pueden establecer puentes de hidrógeno a través de interacciones locales para formar hélices alfa u hojas beta plegadas. A su vez, la estructura terciaria y cuaternaria está determinada principalmente por las interacciones entre las cadenas laterales hidrofóbicas que, por regla general, se encuentran en el interior de la proteína.

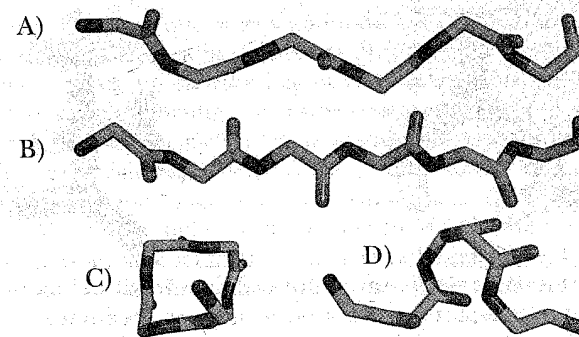


Figura 4.10. El enlace peptídico es plano. A y B dos vistas de la cadena principal de un hexapéptido. En A se muestra la planaridad del enlace peptídico, el arreglo entre los aminoácidos es en zigzag; sin embargo, se puede trazar una línea recta entre el vértice de un carbono alfa a otro carbono alfa (en verde). Este esqueleto corresponde a un segmento de una hebra beta. C y D. Dos vistas de un pentapéptido correspondiente a un segmento de una alfa hélice. Los carbonos alfa entre los cuales se observa planaridad están en azul claro. La comparación entre las figuras superior e inferior muestra que los ángulos que rotan libremente corresponden a los enlaces N-C $\alpha$  (azul a verde o azul cielo) y C $\alpha$ -C (verde o azul cielo que conecta con el carbono enlazado al oxígeno en rojo). Estos son los principales ángulos de torsión en la cadena polipeptídica y se les conoce como **ángulos  $\phi$  y  $\psi$** , respectivamente.

En contrapunto a las cadenas hidrofóbicas, la mayoría de las cadenas laterales polares están expuestas al solvente que rodea a las proteínas (las proteínas de membrana siguen las mismas reglas, excepto que el medio que las rodea en su parte membranaral no es acuoso). Todo esto resulta de la tendencia natural de los grupos hidrofóbicos de rechazar el agua, y de los grupos polares a solvatare (o mojarse) por agua (figura 4.15). Se recuerda que la concentración de agua en una solución acuosa es de 55 M, lo cual convierte al agua en un solvente ideal para conferir a las proteínas su estructura tridimensional. De hecho, muchos investigadores consideran que el agua ha sido un ingrediente esencial en la evolución de las proteínas.



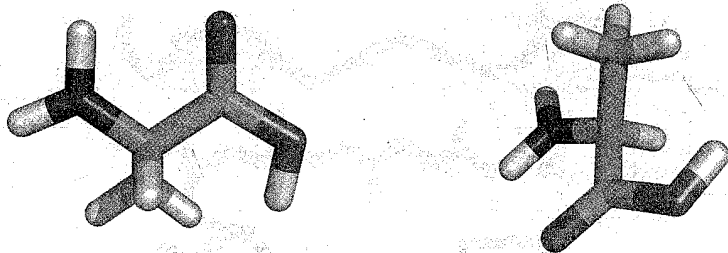


Figura 4.11. Dos vistas de la estructura tridimensional del aminoácido alanina (Ala, A). En esta representación se incluyen los átomos de hidrógeno (en blanco) (los modelos tridimensionales como los que se presentan en la figura 4.12 generalmente omiten dichos átomos). Los átomos de carbono se encuentran en verde, los de oxígeno en rojo y el átomo de nitrógeno en azul. El carbono alfa es el átomo quiral (en verde) que se encuentra en el centro de ambos dibujos. Es interesante comparar la representación en esta ilustración con la del mismo aminoácido en la siguiente figura.

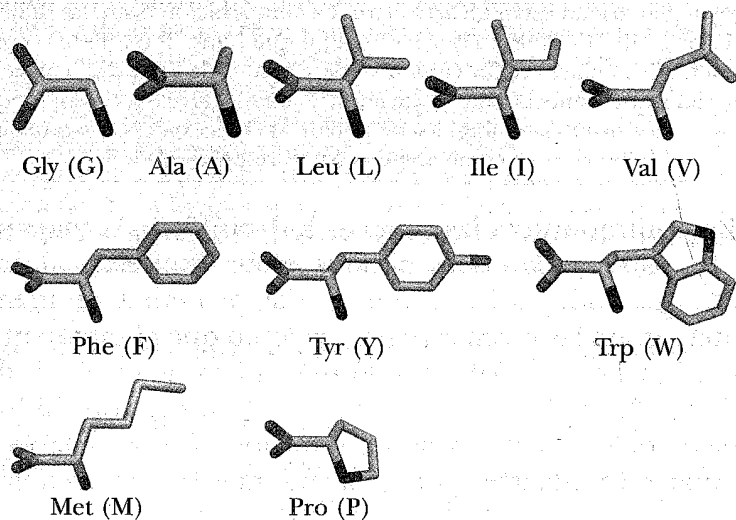


Figura 4.12. Estructura tridimensional de aminoácidos no polares. En esta y las siguientes figuras se muestra la estructura de los veinte aminoácidos que se encuentran en las proteínas. Las cadenas laterales de los aminoácidos son las que en última instancia definen las características particulares de una proteína. Dichas características se pueden modelar

finamente gracias a que varios aminoácidos comparten características similares. Los aminoácidos se pueden dividir en dos grandes grupos: no polares y polares, en los que hay otras subdivisiones. En esta figura se presentan los aminoácidos con características no polares. En el primer renglón se muestra la glicina (en muchas ocasiones se abrevia Gly o G), que es el aminoácido más pequeño. Su cadena lateral es formada por un átomo de hidrógeno. Siguiendo de izquierda a derecha se muestra la alanina (Ala, A) que tiene un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) como cadena lateral. Enseguida están la leucina (Leu, L) y la isoleucina (Ile, I) que difieren en un grupo metilo. La valina (Val, V) completa esta serie de aminoácidos. En el segundo renglón se encuentran los aminoácidos llamados aromáticos: la fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y) y triptófano (Trp, W). La tirosina posee un grupo hidroxilo (en rojo) y el triptófano un grupo imino (en azul) que les confiere cierta polaridad. En el tercer renglón se encuentran la metionina (Met, M), que cuenta con un átomo de azufre (en amarillo) y la prolina (Pro, P), un iminoácido cíclico relativamente rígido que por tener comprometido su grupo amino (en azul) en su anillo pirrólico, no puede formar puentes de hidrógeno con los grupos carbonilo de la cadena principal. Esta característica le impide formar parte de una estructura secundaria de tipo hélice alfa u hoja beta plegada (salvo en sus extremos); en cambio, la prolina es un componente frecuente en las asas y vueltas.

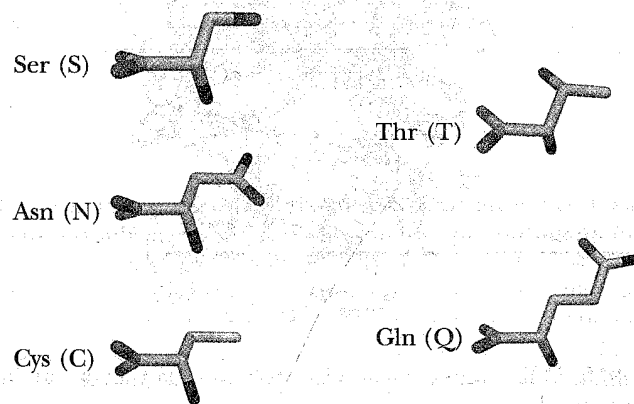


Figura 4.13. Estructura tridimensional de los cinco aminoácidos polares. Primer renglón: Serina (Ser, S) y treonina (Thr, T); difieren en un grupo metileno, al igual que en el segundo renglón lo hacen asparagina (Asn, N) y glutamina (Gln, Q). Tercer renglón: Cisteína (Cys, C) que posee un átomo de azufre en su cadena lateral (amarillo); en muchas proteínas este aminoácido se utiliza en la formación de puentes disulfuro.

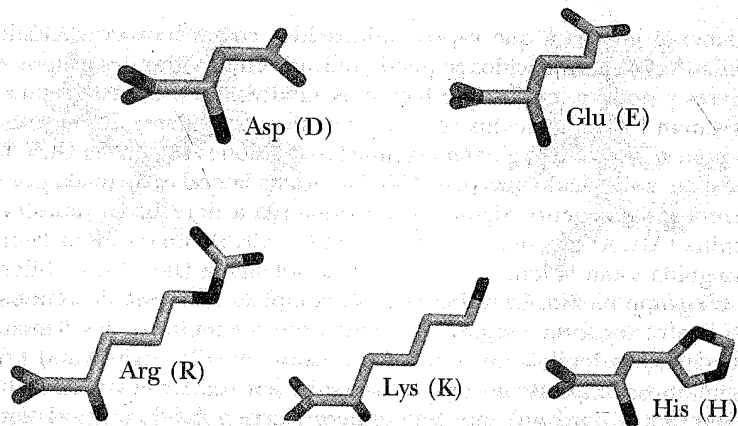


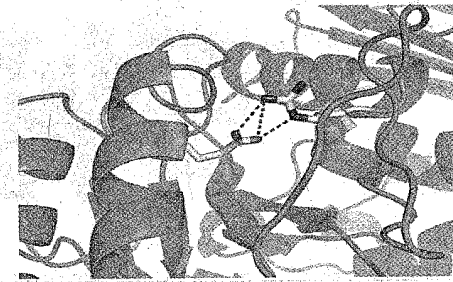
Figura 4.14. Estructura tridimensional de los aminoácidos con carga neta. Primer renglón: aminoácidos cargados negativamente, ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E). Segundo renglón: aminoácidos con carga positiva: arginina (Arg, R), lisina (Lys, K) e histidina (His, H).



Figura 4.15. El llamado **colapso hidrofóbico** es la fuerza que impulsa el plegamiento de las proteínas. La tendencia natural de los residuos hidrofóbicos para rechazar el agua es la fuerza que promueve que dichos aminoácidos interactúen unos con otros. Representación de la distribución de aminoácidos hidrofílicos (rojo) e hidrofóbicos (amarillo) en una proteína globular, la prolina cis/trans isomerasa (código PDB 2CPL). Note que los aminoácidos hidrofóbicos tienden a concentrarse en el interior de la proteína, aunque no es raro encontrarlos en el exterior.

Existen además otros factores que con frecuencia se utilizan para estabilizar la estructura de las proteínas: puentes salinos (figura 4.16), puentes disulfuro, iones metálicos (figura. 4.17) y moléculas de agua que se encuentran en el interior de las proteínas.

A)



B)

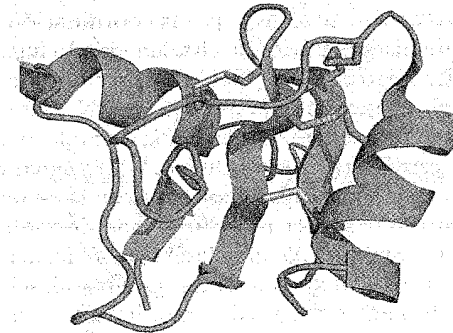


Figura 4.16. Interacciones que ayudan a estabilizar proteínas. Puentes de sal y puentes disulfuro. Además de los puentes de hidrógeno entre los átomos de la cadena principal que estabilizan la estructura secundaria, y las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos que estabilizan la estructura terciaria, en la estabilización de las proteínas intervienen otros factores. A) Los puentes salinos se forman por la interacción de cadenas laterales de residuos con carga opuesta. La ilustración muestra la interacción entre el ácido glutámico 27 y la arginina 387 de la alfa amilasa de saliva humana (código PDB 1SMD). B) Los puentes disulfuro se establecen por la oxidación de dos residuos de cisteína (en amarillo) que a través de uniones covalentes forman una unión disulfuro. Este tipo de unión se encuentra frecuentemente en proteínas que se secretan al medio extracelular. La que se muestra aquí es una toxina de alacrán que posee cuatro puentes disulfuro (código PDB 1T0Z).

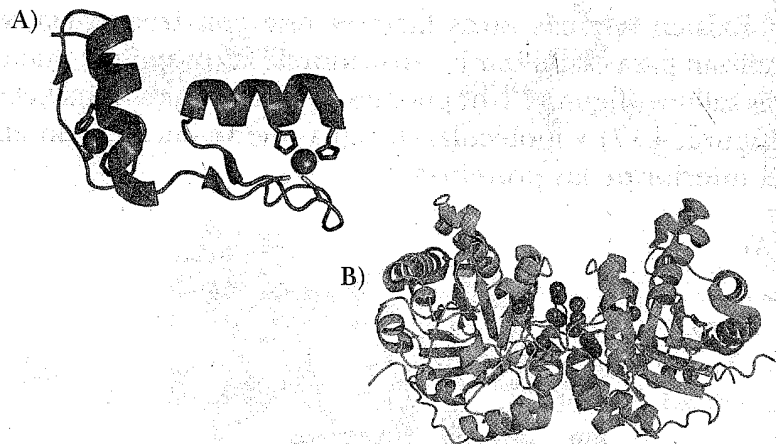


Figura 4.17. Interacciones que ayudan a estabilizar proteínas. Metales y agua. A) Los dedos de zinc se forman por la coordinación de un ión zinc por dos residuos de histidina y dos de cisteína, dando lugar a una estructura muy estable (código PDB 1UN6). Los dedos de zinc se utilizan frecuentemente en el reconocimiento de ADN y ARN. Más de un tercio de las proteínas conocidas son metaloproteínas; emplean iones como el zinc por razones estructurales o catalíticas. B) El agua, como solvente universal, también ejerce un papel importante en la estabilización de las proteínas. La figura muestra la red conservada de moléculas de agua (esferas rojas) que estabiliza la interfase que se forma entre los dos monómeros de la triosafosfato isomerasa. La estabilización es mediada por puentes de hidrógeno entre los dos monómeros (código PDB 2JK2). Las alteraciones de esta red dan como resultado una enfermedad letal en el hombre.

## 5. RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN

Todas las proteínas actúan a través de interacciones con otras moléculas. A las moléculas que se unen a las proteínas se les llama genéricamente **ligandos**. Por lo general, las enzimas poseen cavidades cuya función es alojar al sustrato, o sea la molécula que van a modificar; es usual que los sustratos sean moléculas de bajo peso

molecular (por ejemplo ver el caso de la TIM, en la figura 4.1). La porción de la enzima al que se une el sustrato, se conoce como **centro activo** o **sitio activo**. En cierta forma el sitio activo contiene aminoácidos cuya función es acomodar y fijar al sustrato en la posición adecuada para que otros aminoácidos del centro activo lleven a cabo la reacción química. Estas características se manifiestan claramente en la estructura cristalográfica de la treonil ARNt sintetasa (figura 5.1).

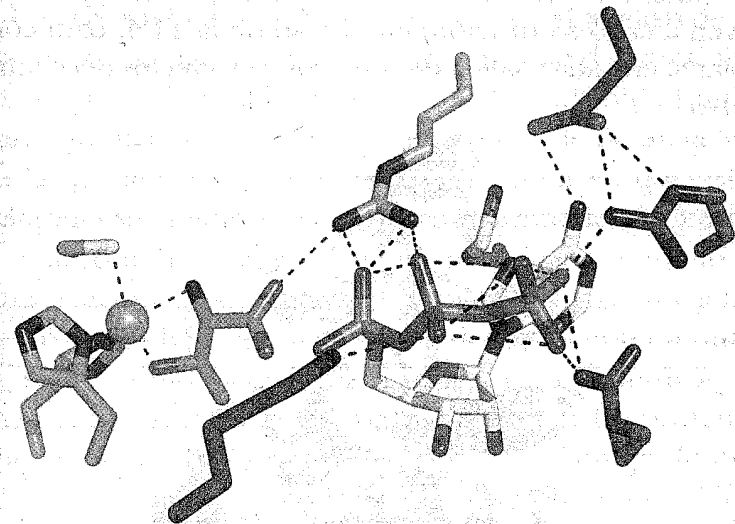


Figura 5.1. Comparación de sitios de unión y sitios activos. En la treonil ARNt sintetasa (código PDB INYR) se identifica al aminoácido treonina (en verde) gracias a un ion zinc (esfera naranja) que reconoce al grupo hidroxilo característico de este aminoácido, así como al grupo amino. El ion zinc se coordina por los residuos marcados en azul claro. El aminoácido se activa con una molécula de ATP (en amarillo con los grupos fosfato en rojo) que es reconocido por los residuos marcados en magenta. La activación de la treonina es mediada por un residuo de arginina (en gris). Este ejemplo muestra cómo el reconocimiento molecular puede implicar varios aminoácidos, mientras que la catálisis depende sólo de unos pocos.

### 5.1. Triosafosfato isomerasa

Es necesario mencionar que la catálisis enzimática es un proceso dinámico. Por ejemplo, en la TIM, el sustrato puede fijarse a la enzima gracias en parte a una "tapa" formada por un asa móvil (figura 5.2). La función de la tapa también es la de aislar al sustrato del medio externo y evitar reacciones indeseables. La flexibilidad de esta región es un ejemplo de la dinámica de las proteínas y cómo los movimientos proteicos se usan para que las proteínas lleven a cabo su función, en el caso de la TIM, para controlar la entrada y salida de sustratos y productos del centro activo.

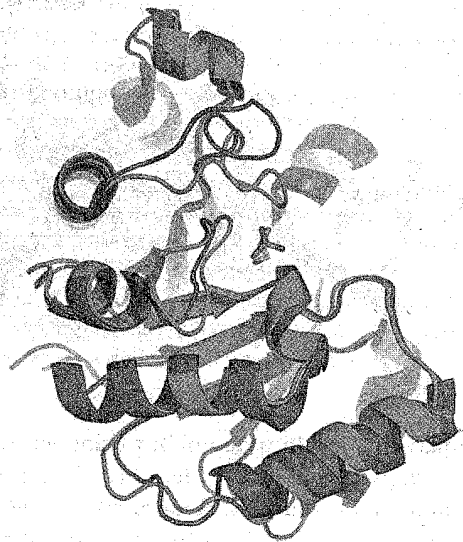


Figura 5.2. Dinámica de las proteínas y catálisis. Las proteínas poseen regiones flexibles que en muchas ocasiones regulan la entrada y salida de sustratos y productos. La figura muestra a la TIM con su centro activo vacío (en magenta, código PDB 1TRE); en verde se representa la estructura de la enzima cuando su centro activo está ocupado por un análogo del sustrato (código PDB 6TIM). La región conocida como asa 6 funciona como una tapa que aísla al sustrato de medio acuoso.

Se mencionó anteriormente que muchas enzimas poseen el mismo tipo de esqueleto (figura 4.4). Por ejemplo, la TIM posee una estructura llamada barril alfa/beta, formada por varias hojas beta centrales que a su vez están rodeadas por hélices alfa. Existen muchas enzimas que poseen la estructura de barril alfa/beta, por tanto se piensa que las estructuras básicas y comunes a muchas enzimas fueron el templado sobre el cual se formaron distintos centros activos.

En relación a este punto se señala que el análisis de las proteínas que pertenecen a organismos de distintos niveles de la escala biológica ofrece una oportunidad única para estudiar cómo ha sido la evolución de la estructura de las proteínas y la secuencia o el orden en que están colocados sus aminoácidos (**estructura primaria**). De hecho, el análisis de la estructura de las proteínas y el grado de conservación de su estructura primaria en varios cientos de proteínas han sido fundamentales en el entendimiento sobre cómo ocurrieron los procesos evolutivos. El análisis de estos datos ha revelado que en las proteínas que llevan a cabo la misma función existe un grado muy alto de conservación de su estructura tridimensional. Por el contrario, existe mucha variabilidad en su estructura primaria; sin embargo, los residuos que forman el sitio catalítico han sufrido muy pocos cambios durante la evolución (figura 5.3). Esto parece decir que una vez que se encontró una estructura funcional y estable, la evolución la conservó por millones de años en todos los organismos.

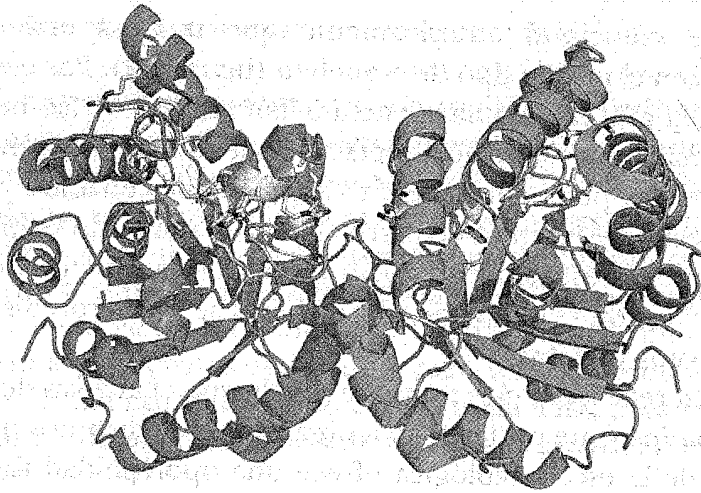


Figura 5.3. Conservación de aminoácidos en las proteínas. El caso de la trifosfato isomerasa. Sólo hasta los últimos años ha sido posible contar con las secuencias de aminoácidos de miles de proteínas que pertenecen a distintas especies. Estos datos han permitido conocer cuáles aminoácidos se han conservado a través de la evolución. Se muestra como ejemplo la trifosfato isomerasa. Los aminoácidos que son absolutamente conservados (en color amarillo) se colocaron en la estructura tridimensional de la enzima del *Homo sapiens*. Muchos de ellos corresponden a los que forman el sitio activo, pero también se encuentran otros que aparentemente son necesarios para mantener la estructura y estabilidad de la enzima. En el ejemplo, es interesante notar que los diecisiete aminoácidos conservados se encuentran en la "cara" de la enzima en la que se encuentra el sitio activo.

## 5.2. Las aminoacil ARNt sintetetasas

Siguiendo con la historia de las proteínas, a continuación se describe una enzima con un alto grado de complejidad y de gran tamaño: las aminoacil ARNt sintetetasas (aaRS). Estas enzimas representan posiblemente al grupo de proteínas más antiguo. Son proteínas esenciales del aparato traduccional de todos los seres vivos y además son

el punto de contacto entre el mundo del ARN y el de las proteínas. Específicamente reconocen una molécula de ARNt (ARN de transferencia) y lo unen a su aminoácido respectivo para que una vez que llegan al ribosoma se continúe el ensamblaje de los aminoácidos que forman la proteína (figura 5.4). Dado que existen en general veinte aminoácidos comunes en los seres vivos, hay veinte diferentes ARNts. Es importante notar que la función de estas enzimas es altamente específica y precisa, ya que un error en la incorporación de un aminoácido en una posición incorrecta puede dar lugar a la formación de una proteína inestable o no funcional, lo cual puede ser letal.

En la figura 5.5 se muestra la representación del homodímero de la treonil ARNt sintetasa (aaRS). En uno de los monómeros, que consta de unos 650 aminoácidos, están representadas cuatro regiones, cada una de distinto color. Cada región corresponde a partes de la cadena

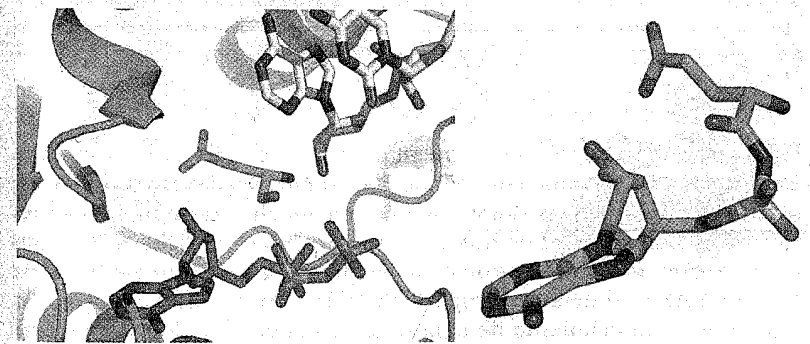


Figura 5.4. Aminoacil ARNt sintetetasas. Estas enzimas catalizan una reacción que se conoce como aminoacilación del ARNt. El ácido glutámico (en azul claro) es activado por una molécula de ATP (en magenta) para formar un aminoacil adenilato (a la derecha, en verde) que posteriormente se transfiere a una molécula de ARNt (se muestra una parte de esta molécula en color amarillo en la figura del lado izquierdo) (Códigos PDB 2CV1 y 2CV2).

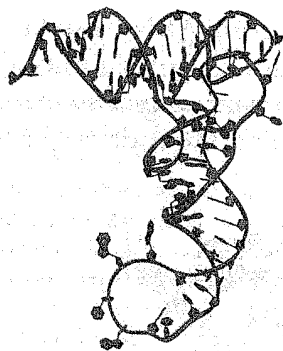
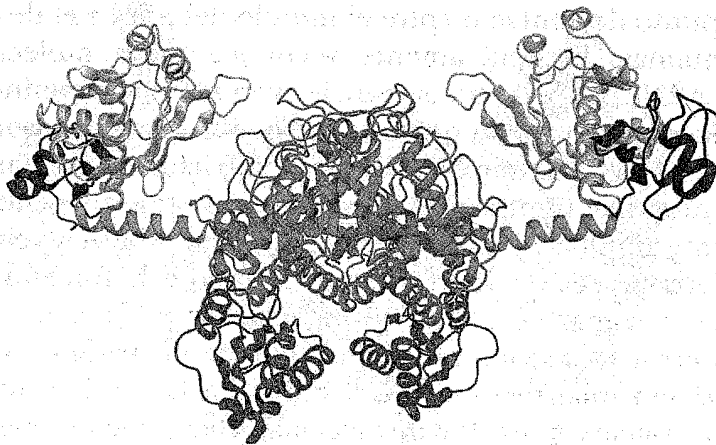


Figura 5.5. Algunas proteínas poseen unas secciones llamadas dominios. En general, las proteínas con más de 300 aminoácidos están divididas en secciones denominadas dominios que, en muchas ocasiones, realizan funciones específicas. Los dominios son regiones globulares discretas en la estructura tridimensional de la proteína. Arriba: dominios de la treonil ARNt sintetasa (código PDB 1QF6). El dominio en rojo es la región de reconocimiento de la porción del anticodón del ARNt (parte inferior de la molécula de ARNt mostrada abajo). El dominio en verde corresponde a la región catalítica, la cual contiene los aminoácidos necesarios para llevar a cabo la reacción de aminoacilación (unión de la treonina a su ARNt específico). El dominio en amarillo se encarga de corregir los errores que se pueden producir en el dominio catalítico, cuando se incorporan incorrectamente residuos de serina en lugar de treonina. La serina tiene un grupo metileno ( $\text{CH}_3$ ) menos que la treonina, el sitio catalítico no distingue entre estos dos residuos.

polipeptídica que tienen una estructura terciaria bien definida e independiente del resto de la proteína. A estas partes de la estructura se les denomina dominios. Se ha observado que el tamaño máximo de un dominio es de unos 300 aminoácidos. En muchas ocasiones, se puede asignar a cada uno de los dominios de la proteína una función específica, como es el caso de las aaRS.

Las ARNt sintetetas son un ejemplo y un paradigma excepcional de los procesos que han ocurrido en la evolución. Ahora se sabe que estas enzimas se pueden dividir en dos clases (figura 5.6) que son claramente distintas.

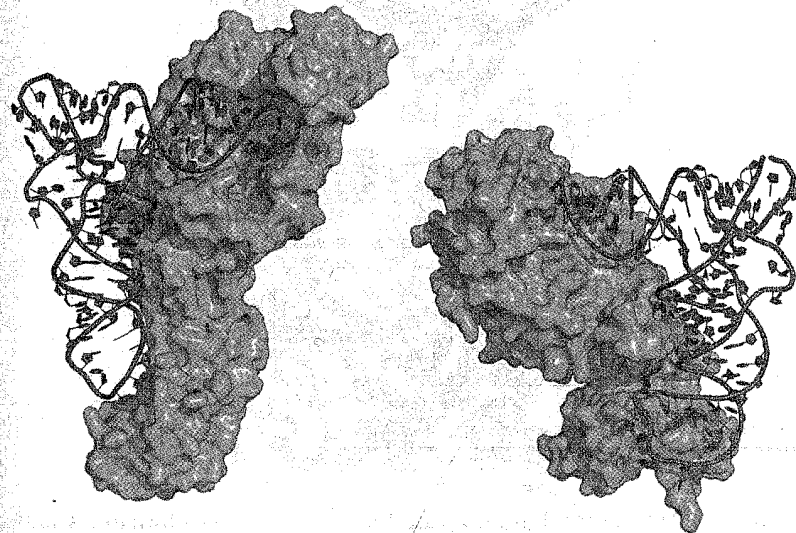


Figura 5.6. Diferente estructura, misma función. En esta figura y en la siguiente se ilustra cómo proteínas con diferente estructura llevan a cabo funciones muy similares. Las ARNt sintetetas son un ejemplo de estas enzimas. Izquierda: enzimas de clase I, glutamyl ARNt sintetasa (código PDB 1N78). Derecha: enzimas de clase II, representada por la estructura de la aspartil ARNt sintetasa (código PDB 1ASZ). Las enzimas reconocen a sus sustratos de ARNt en regiones drásticamente diferentes.

Tanto en su estructura primaria como en su estructura tridimensional, no hay relación alguna entre ellas (figura 5.7), lo cual las convierte en un ejemplo impresionante de cómo dos plegamientos diferentes adquirieron una

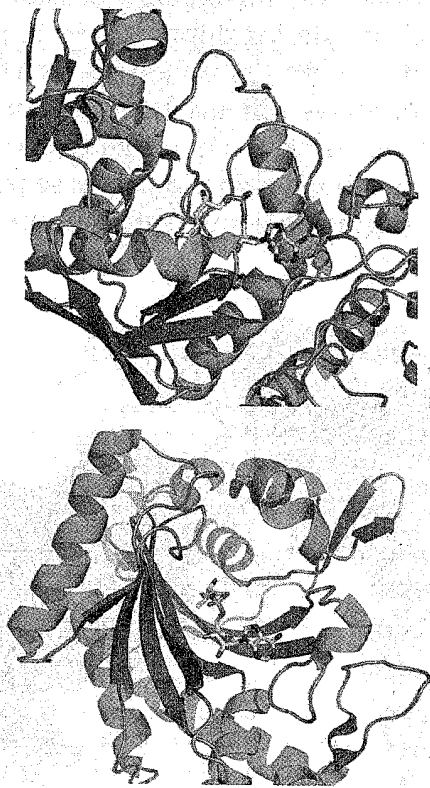


Figura 5.7. Diferentes dominios catalíticos que expresan funciones similares. Aquí se comparan los dominios catalíticos en las dos clases de aminoacil ARNt sintetetas. Arriba: enzimas de clase I, la glutamil ARNt sintetasa (código PDB 1N78). Abajo: enzimas de clase II, representada por la treonil ARNt sintetasa (código PDB 1EVL). La arquitectura del sitio activo es radicalmente diferente en las dos clases de enzimas. El plegamiento de la clase I corresponde a un arreglo que se conoce como Rossmann fold, el cual está ampliamente extendido en la naturaleza, mientras que la arquitectura del sitio activo de las enzimas de clase II sólo se ha encontrado en este tipo de enzimas.

misma función. Esto está en clara contraposición al barril alfa/beta de la TIM, que representa un ejemplo de que una misma estructura básica adquirió distintas funciones. En su conjunto las observaciones en las enzimas ilustran los diversos caminos que puede seguir la evolución para resolver exitosamente un problema.

Las aminoacil ARNt sintetetas también ilustran de manera muy clara la flexibilidad de las enzimas y cómo este fenómeno participa en la cooperatividad que es característica de muchas de ellas. Para visualizar estos procesos se pueden observar los cambios que sufre el centro activo de la aminoacil ARNt sinteteta cuando se une a sus sustratos (aminoácido y ATP) (figura 5.8). La unión de estas



Figura 5.8. Dinámica de las proteínas. Los movimientos que las proteínas llevan a cabo se ejemplifican aquí con la treonil ARNt sinteteta. La enzima tiene cuatro regiones móviles en el dominio catalítico. La estructura apo (en ausencia de sustrato) se muestra en azul claro. Las regiones en color son las que se mueven en respuesta a la unión del aminoácido (regiones roja, morada y amarilla) y del ATP (regiones verde y morada). Para la creación de esta figura se utilizaron los códigos PDB 1EVK y 1NYR.

pequeñas moléculas ocasiona grandes desplazamientos de la cadena principal en amplias regiones de la enzima. El reconocimiento de estos sustratos no depende de estos movimientos, sólo reflejan la dinámica de la enzima cuando realiza su función catalítica.

### 5.3. La ATP sintasa

En un último ejemplo del mundo de las enzimas se describe un complejo molecular formado por distintas proteínas. Su función es la de sintetizar la mayor parte del ATP que las células utilizan para llevar a cabo sus múltiples trabajos. Este complejo, conocido como ATP sintasa, se encuentra en las membranas plasmáticas de las bacterias, cloroplastos y mitocondrias. La función de la enzima no es trivial; transforma la energía que proviene de la oxidación de sustratos o la energía luminosa (en el caso de los organismos fotosintéticos) en energía química: la que se encuentra en la molécula de ATP. Por mecanismos que no se describen en este capítulo, los procesos que acompañan a la oxidación de sustratos o a la fotosíntesis dan lugar al transporte de electrones a través de varios compuestos. Este proceso da lugar a la translocación de protones ( $H^+$ ) de un lado a otro de la membrana; el resultado es la creación de un gradiente electroquímico de  $H^+$ , el cual es una forma de energía. La función de la ATP sintasa es transformar la energía de este gradiente en energía química; específicamente, la enzima cataliza la unión de fosfato inorgánico a ADP para formar ATP.

El descubrir los mecanismos moleculares que operan dentro de este complejo tomó muchos años de trabajo

por muchos grupos de investigadores. Un punto crucial de los estudios fue el conocimiento de la estructura tridimensional de la enzima. Desde el punto de vista de la estructura y función de las proteínas, la ATP sintasa es una de las enzimas más complejas que se conocen; está formada por más de 20 proteínas diferentes, encontrándose varias copias de muchas de ellas dentro del complejo.

Tal vez lo más impresionante de la enzima es cómo lleva a cabo su función. La transformación de la energía de un gradiente electroquímico en la energía química representada por el ATP involucra la rotación de una proteína dentro de un nicho formado por otras proteínas; la energía que impulsa la rotación proviene del gradiente electroquímico. Debido a esto, se considera que la ATP sintasa es uno de los primeros motores moleculares que existieron; se puede considerar que el complejo es una turbina que transforma la energía del gradiente de protones en energía química.

Para mostrar una idea de la complejidad estructural y funcional de la enzima, en las figuras 5.9 a 5.12, se presentan imágenes cristalográficas de la misma. A partir de estos datos y muchos otros enfoques, se logró tener una visión de la enzima en movimiento, la cual está disponible en <http://www.youtube.com/watch?v=uOoHKCMAUMc>.





Figura 5.9. Estructura global de la ATP sintasa. Reconstrucción de parte de la estructura tridimensional de la ATP sintasa, el complejo multiproteico encargado de transformar la energía de un potencial electroquímico en energía química mediante un mecanismo que involucra la rotación de unas proteínas dentro de otras. El complejo cuenta con una parte transmembranal rotatoria (en verde, subunidad F0). La rotación de este segmento se promueve por el paso de protones a través de un sistema de proteínas que se le ha llamado canal. La región que se proyecta hacia fuera de la membrana se denomina F1 (en azules claro y oscuro). La región en azul claro rota en respuesta al movimiento de F0. Esta rotación promueve cambios conformacionales en la región en azul oscuro que están asociados a la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. La región en rojo es el estator que impide la rotación de la región en azul oscuro. Códigos PDB 1C17, 1E79, 2A7U y 1L2P.

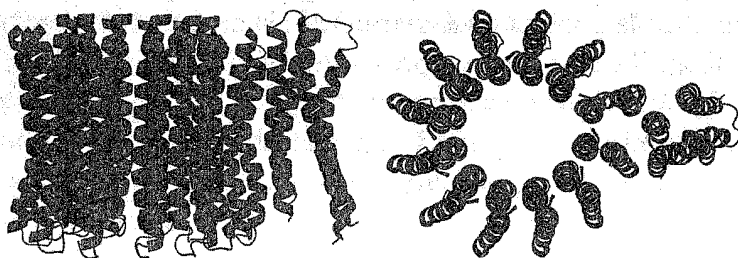


Figura 5.10. Dos vistas de la subunidad transmembranal (F0) de la ATP sintasa (código PDB 1C17). En la izquierda se muestra una vista lateral del canal de H<sup>+</sup> y a la derecha el canal visto desde su parte superior.

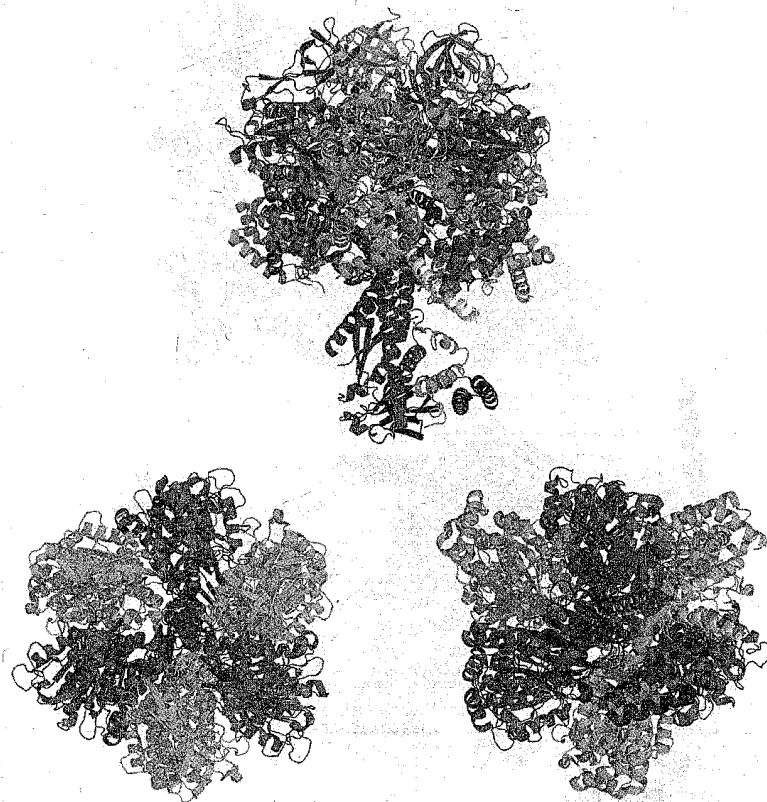


Figura 5.11. Tres vistas del complejo F1 de la ATP sintasa (código PDB 2V7Q). Esta porción de la ATP sintasa se compone de por lo menos seis proteínas distintas, algunas de las cuales se encuentran en múltiples copias. Aquí se destacan las tres subunidades llamadas alfa que están en color azul claro, las tres subunidades beta están en magenta, la única subunidad gamma está en rojo. Nótese que esta subunidad se encuentra en el centro de las subunidades alfa y beta. La subunidad delta en azul, la epsilon en verde y la llamada proteína inhibidora en amarillo. En la porción F1 se llevan a cabo los procesos catalíticos que dan lugar a la formación de ATP, cuya síntesis se acompaña de la rotación de la subunidad gamma en el centro de las subunidades alfa y beta. La proteína inhibidora regula la hidrólisis del ATP.

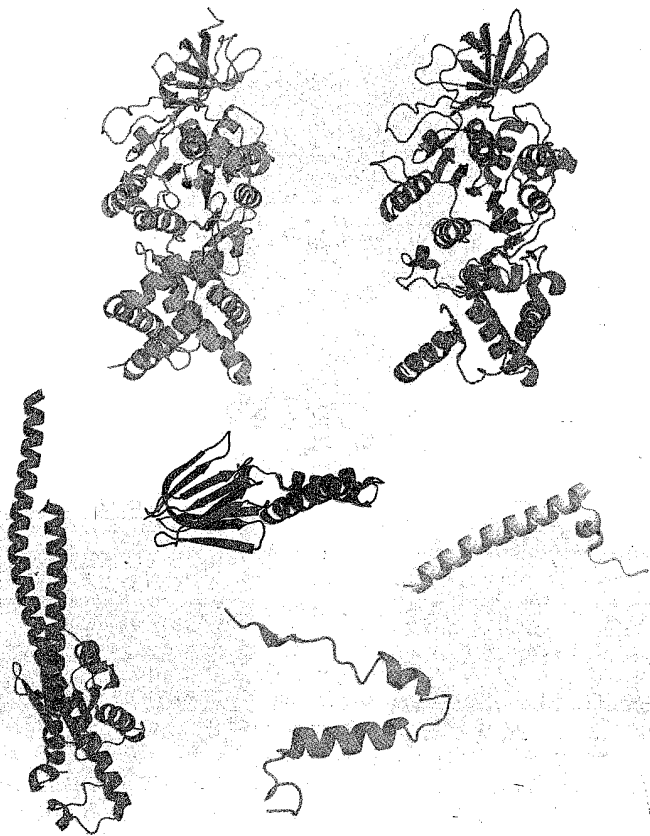


Figura 5.12. Proteínas que conforman a la porción F1 de la ATP sintasa. El código de colores es el mismo que en la figura anterior: subunidades alfa, azul claro; beta, magenta; gamma, rojo; delta, azul; epsilon, verde; proteína inhibidora, amarillo. Aunque a nivel de su estructura global las subunidades alfa y beta son muy parecidas entre sí, las subunidades difieren en su estructura primaria. Los procesos catalíticos se llevan a cabo principalmente en la subunidad beta. La estructura de las otras subunidades que forman el complejo F1 son muy diferentes, y por sí solas no muestran ninguna función (excepto la subunidad beta, que en su forma aislada puede llevar a cabo catálisis, pero a muy baja velocidad). Por tanto, el complejo F1 funciona a máxima velocidad cuando todas sus subunidades se colocan en su debido lugar. El complejo de la ATP sintasa es un excelente ejemplo de cómo un grupo muy numeroso de proteínas diferentes interactúan para formar una gran estructura funcional.



Figura 5.13. Mecanismo de acción de la ATP sintasa. Dos vistas de la porción F1 de la ATP sintasa. Para facilitar su visualización, las figuras sólo incluyen las tres subunidades beta (en verde) y la superficie de parte de la subunidad rotatoria gamma (en rojo). Las dos hélices de la subunidad gamma no forman un cilindro perfecto, sino que se insertan asimétricamente en las interfases de las tres subunidades beta. Al rotar, la asimetría de la subunidad gamma promueve los cambios conformacionales necesarios para que las subunidades beta sinteticen ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. En un giro de 360° de la subunidad gamma, se forman tres moléculas de ATP que provienen de cada una de las tres subunidades beta.

## 6. INCÓGNITAS

A pesar del enorme avance que ha tenido el campo de la estructura y función de proteínas, aún quedan muchos problemas por resolver. Por ejemplo, es muy difícil predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. Aun los mejores programas de cómputo actuales, sólo pueden predecir estructuras de menos de 150 aminoácidos; además, su ejecución requiere una enorme capacidad computacional. Incluso en los casos en los que se quiere modelar una mutante puntual (es decir una proteína en la que sólo se ha cambiado un aminoácido), muchas veces el modelo no logra explicar las alteraciones funcionales que puede ocasionar dicha mutación.

Es importante añadir que, desde el punto de vista farmacológico, existe mucho interés por conocer cómo alteran la función de las proteínas determinados compuestos. Incluso se sabe que compuestos muy parecidos, al unirse a su receptor o molécula blanco, pueden ejercer efectos muy diferentes. Si se contara con suficiente información sobre la dinámica de las proteínas y cómo se ve afectada ésta por la unión de los ligandos, se facilitaría el diseño de nuevos fármacos.

Por último, la definición estructural de supracomplejos de proteínas con múltiples subunidades, tales como los complejos reguladores de la transcripción, ha sido un objetivo que sólo se ha podido alcanzar parcialmente. En gran medida, esto se debe a que muchas de las interacciones entre sus componentes son de baja afinidad y a que los complejos tienen una vida media muy corta. El estudio de esos conjuntos y de las interacciones de una proteína con otras proteínas y otros componentes será en el futuro próximo una línea de investigación muy activa.

El objetivo último es ver literalmente cómo trabaja estructuralmente una célula, en un momento determinado.

En resumen, aún faltan herramientas y consideraciones teóricas para modelar fielmente una proteína *in silico* y establecer una relación estructura-función para poder predecir cuáles son las posibles interacciones de las proteínas con otras moléculas. Sólo cuando se llegue a este punto se podrá afirmar que existe una comprensión total de los factores que determinan la estructura tridimensional de las proteínas.

El presente capítulo tiene como finalidad despertar el interés por conocer más profundamente el campo de la estructura de las proteínas y cómo ésta se relaciona con su función. Para ello, se ofrecieron ejemplos de algunas macromoléculas con las que los autores han trabajado, pero muchas otras de las proteínas y complejos moleculares que se mencionaron han sido objeto de estudio por numerosos grupos de la comunidad científica.

### LECTURAS RECOMENDADAS

1. Branden C. y Tooze J., *Introduction to protein structure*, Garland Publishing, segunda edición (1999).
2. Creighton T. E., *Proteins: structures and molecular properties*, Oxford University Press (1992).
3. Lesk A., *Introduction to protein science: architecture, function and genomics*, Oxford University Press (2004).
4. Petsko G. A. y Ringe D., *Protein structure and function*, New Science Press (2004).
5. Whitford D., *Proteins: structure and function*, Wiley (2005).

## **CAPÍTULO 7**

# **LAS INTERACCIONES FUNDAMENTALES EN LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS Y OTRAS BIOMOLÉCULAS**

**EDGAR VÁZQUEZ CONTRERAS\***  
*Departamento de Ciencias Naturales  
UAM-Cuajimalpa*

### **1. INTRODUCCIÓN**

En este capítulo se comenta sobre la naturaleza y las magnitudes de las fuerzas dominantes en el plegamiento de las proteínas las cuales, en general, también participan en la estabilización de otras biomoléculas y estructuras celulares. Debido a que las proteínas son sólo marginalmente estables a temperatura ambiente, todos los tipos de interacciones que participan en su estabilización molecular son importantes; incluso las pequeñas interacciones pueden contribuir de manera significativa en forma positiva o negativa a la estabilidad de estas biomoléculas [1,2]. Sin embargo, la presente revisión tiene como objetivo identificar únicamente las principales fuerzas que conducen a las características estructurales de las proteínas globulares como son: su extraordinaria compactación, su núcleo de residuos no polares, y gran cantidad de arquitectura interna.

\* evazquez@correo.cua.uam.mx

En este capítulo también se exploran las contribuciones a la energía libre del plegamiento derivadas de las interacciones electrostáticas (repulsiones de carga clásicas y apareamiento de iones), los puentes de hidrógeno, las interacciones de van der Waals y los contactos hidrofóbicos. El objetivo es proporcionar una evaluación de los factores importantes para el plegamiento de las proteínas. También se considerarán las fuerzas opuestas, como la entropía conformacional.

## 2. ASPECTOS HISTÓRICOS

El proceso del plegamiento de las proteínas se conoce desde los años sesenta del siglo pasado. Aunque los orígenes del estudio de la estructura de estas biomoléculas se remontan al inicio del siglo xx, cuando Emil Fischer y Franz Hofmeister en forma independiente llegaron a la conclusión de que las proteínas son cadenas de aminoácidos unidos covalentemente (revisado en [3]). En esa época, la dificultad para encontrar las condiciones adecuadas para solubilizar a las proteínas, fue el mayor obstáculo para una comprensión profunda de su estructura y de los cambios conformacionales que éstas pueden desarrollar. En 1911 Chick y Martin [4] describieron por vez primera el proceso de desnaturalización de las proteínas y fueron capaces de distinguirlo del proceso de la agregación inespecífica de estas biomoléculas (como la coagulación).

Para la segunda década del siglo xx, el proceso de desnaturalización se consideraba de dos formas: como la hidrólisis del enlace peptídico [5,6] o como la deshidratación de la proteína [7]. La idea de que la desnaturalización de las proteínas es un proceso de desplegamiento

fue presentada por primera vez por Wu quien propuso que en las proteínas nativas (es decir aquellas directamente obtenidas de las células y que poseen su función natural), existe la presencia de patrones regulares de plegamiento de la cadena de aminoácidos de forma tridimensional, algo parecido a lo que ocurre en la red de un cristal; este autor también propuso que dichos patrones regulares se mantienen unidos por enlaces no covalentes, tema que se revisará más adelante. La desnaturalización de proteínas es entonces la ruptura de estas interacciones lábiles, ocasionando que la estructura de la proteína pase de ser compacta a dispersa y en donde la superficie se altera y el interior de la molécula se expone al solvente [8]. La desnaturalización es la desorganización de la molécula de la proteína, es el cambio de un arreglo regular de una estructura rígida a uno irregular y difuso de la cadena abierta que ahora es flexible [8].

Es importante describir que la estabilidad de la estructura nativa está de acuerdo con la hipótesis termodinámica [9]. Para demostrar la estabilidad termodinámica, es suficiente demostrar que la estructura nativa es una función de estado y por tanto no depende del proceso o de las condiciones iniciales que conducen a dicho estado, el cual por definición sería el mínimo global de la energía libre relativa a todos los demás estados accesibles en esa escala de tiempo. Los experimentos de Anson y Mirsky [10] y Anson [11] demostraron que el plegamiento de la hemoglobina es reversible como lo ponen de manifiesto las similitudes en las siguientes propiedades de las proteínas nativa y renaturalizada: la solubilidad, la cristalizabilidad, las características espectroscópicas, la unión de  $O_2$  y CO y la inaccesibilidad a la digestión por tripsina. A través de estas medidas gruesas de la estructura nativa también se demostró que el plegamiento de la

albúmina sérica y de otras proteínas es igualmente reversible [11,12,13]. Posteriormente fue demostrado que la desnaturalización de algunas proteínas es también termodinámicamente reversible [14,15] y que en el proceso se llevan a cabo grandes cambios conformacionales [16]. A finales del siglo xx y con experimentos de calorimetría de alta resolución se demostró la reversibilidad termodinámica tanto para muchas proteínas globulares de un solo dominio [17,18,19,20], como para algunas proteínas multidominio [21].

La reversibilidad se puso a prueba de forma más específica por los experimentos de Anfinsen y colaboradores, en los que los puentes disulfuro (previamente reducidos), de la ribonucleasa pancreática bovina se ordenan de forma nativa en el proceso de renaturalización, evitando las 105 distribuciones aleatorias posibles y readquiriendo la estructura nativa con actividad biológica [9,22]. La ventaja de la observación de los puentes disulfuro en las proteínas es que son pocos y por tanto identificables, a diferencia de las miles de interacciones no covalentes que también se forman en el proceso. Del mismo modo, se encontró que dos proteínas permutadas circularmente se repliegan a sus estados nativos originales [23,24]. Por lo tanto, a menudo, a pesar de las dificultades extremas en el logro de la reversibilidad, la hipótesis termodinámica ha sido ampliamente establecida. Estos experimentos no implican necesariamente que la reversibilidad sea completamente general para otras condiciones, de otras proteínas o incluso de otras partes de una proteína; de hecho la mayoría de los estudios de plegamiento se enfrentan a la irreversibilidad, lo que dificulta enormemente el análisis del proceso tanto estructural como energéticamente. Es evidente que el plegamiento de algunas proteínas puede ser catalizado por otras como

las llamadas "chaperonas" [9,25,]. Sin embargo, éstas únicamente actúan sobre la velocidad con que una proteína es plegada (demostrando que la chaperona es un verdadero catalizador) y no tiene nada que ver con la hipótesis termodinámica, con la naturaleza de los estados nativos (si la estructura nativa es reversible en otras circunstancias en la escala de tiempo experimental), o con las fuerzas motrices involucradas en el plegamiento. El presente análisis aborda únicamente aquellas proteínas y condiciones de reversibilidad.

En la discusión sobre la naturaleza de las fuerzas involucradas en la estabilidad de las proteínas, es útil distinguir por una parte a las fuerzas de largo y de corto alcance y por la otra a las fuerzas locales y no locales. El alcance de las fuerzas es dependiente de la distancia que involucre la interacción y se define como aquellas energías que dependen de la distancia ( $r$ ) como  $r^p$ , teniendo las siguientes situaciones:

**Largo alcance:** si  $p \leq 3$ , por ejemplo las interacciones ion-ion y ion-dipolo

**Corto alcance:** si  $p > 3$ , por ejemplo las atracciones y repulsiones Lennard-Jones.

Esta dependencia inversa de la distancia a la tercera potencia resulta la división natural ya que para un medio simple y puro, de acuerdo con esta definición, la integral que da la energía total del sistema diverge para fuerzas de largo alcance y converge para las de corto [26]. Para cadenas de polímeros como las proteínas, además del alcance de la fuerza, la posición del segmento particular de la cadena también es importante. Las interacciones locales se llevan a cabo entre segmentos de la cadena que conectan vecinos ( $i, i + 1$ ), o vecinos cercanos, en la

secuencia (como en una hélice alfa). Las interacciones no locales se refieren a los residuos que se apartan significativamente en la secuencia ( $i, i + n$  en donde  $n$  es significativamente mayor a 1 como en una hoja beta plegada). Tanto las interacciones locales como las no locales pueden surgir de cualquier tipo de fuerza *i.e.* de largo o corto alcance.

### 3. INTERACCIONES DE LARGO ALCANCE: ELECTROSTÁTICAS

Debido a que los ácidos y las bases se encuentran entre los primeros desnaturalizantes conocidos para las proteínas, primeramente se asumió que las fuerzas de su plegamiento eran de naturaleza electrostática. La pista que dio paso a la idea de que el proceso está dirigido electrostáticamente es la dependencia de la estructura y la función de las proteínas con los cambios en el pH y/o en la fuerza iónica del medio que las contiene. Considerando que el pH determina la carga total de las proteínas, la presencia de sal modera el grado de interacción entre estas cargas debido a que las sales en solución apantallan cargas.

El primer modelo cuantitativo de la participación de las interacciones electrostáticas en las proteínas nativas fue propuesto por Linderstrom-Lang (revisado en [27]). Este trabajo apareció menos de un año después de la teoría de Debye-Huckel en la cual está basado. Al tratar a la proteína nativa como una partícula esférica polivalente e impenetrable con su red de carga repartida uniformemente en la superficie, Linderstrom-Lang predijo el número de protones unidos y la carga neta de la molécula como función de la concentración de iones de hidrógeno, *i.e.*, lo que en bioquímica se conoce como la curva

de titulación del pH, que es un método experimental. La opinión de que la electrostática de la proteína puede ser representada en términos de las cargas de una esfera de constante dieléctrica baja en un medio dieléctrico elevado (como el agua), es útil todavía en la actualidad. Aunque se han desarrollado mejoras a esta idea, por ejemplo:

1. Se considera la presencia de cargas discretas situadas en posiciones específicas de las proteínas nativas que se suponen esféricas [28,29,30,31].
2. Se han modelado las desviaciones estructurales del estado nativo de la forma esférica [32,33].
3. Se ha desarrollado la teoría electrostática para el estado desplegado, por tanto para las contribuciones de ésta a la energía libre y a la estabilidad [34,35].

Hay dos maneras diferentes en que las interacciones electrostáticas pueden afectar a la estabilidad de las proteínas:

1. Los efectos electrostáticos *clásicos* se deben a las repulsiones inespecíficas que surgen cuando una proteína contiene un número considerable de residuos de aminoácidos con cadenas laterales cargadas, como sucede por ejemplo lejos de su punto isoeléctrico, es decir en pHs extremos. La visión tradicional de estos efectos es que la energía libre electrostática depende del cuadrado de la carga neta de la molécula [36,37]. Por lo tanto, las contribuciones no electrostáticas a la estabilidad de las proteínas se esperan cerca de su punto isoeléctrico, es decir donde el número de cargas positivas y negativas está en balance. Dado que la carga neta en la proteína nativa se incrementa por la disminución (basicidad) o el aumento (acidez) de la concentración de iones hidrógeno de la solución, el incremento en la repulsión de cargas desestabilizará al estado plegado de las proteínas, debido

a que la densidad de carga en este estado de la molécula es mayor que en el estado desplegado. Así pues, el proceso de desplegamiento lleva a un estado de menor energía libre electrostática [1]. Por lo tanto, los ácidos y las bases desestabilizan a las proteínas nativas.

2. Las interacciones específicas a través de cargas también pueden afectar la estabilidad de las proteínas. Por ejemplo, el apareo de iones (puentes salinos) se produce cuando las cadenas de residuos de aminoácidos cargados de forma opuesta se encuentran en estrecha proximidad espacial. Considerando que el mecanismo clásico predice que el aumento de la carga sólo podría desestabilizar al estado plegado, por el contrario, el apareamiento de iones puede estabilizarlo.

Tradicionalmente se ha aceptado que los efectos clásicos y los de apareamiento de iones podrían ser distinguidos en forma experimental de aquellos efectos que produce el aumento en la concentración salina (por debajo de unos 0,1-1,0M) o de la variación de la constante dieléctrica de la solución. A bajas concentraciones la sal afecta principalmente la protección electrostática; en concentraciones más altas la protección electrostática está saturada, entonces los efectos dominantes de la sal, al igual que los de cualquier otro aditivo, están contenidos en las propiedades del solvente de la solución [38,39]. Desde el punto de vista tradicional, se supone que las sales y la constante dieléctrica del medio no afectan la carga neta de la molécula y que afectan a los estados nativos más que al estado desnaturalizado, por lo que a menudo se ha asumido que, tanto la adición salina, como el aumento de la constante dieléctrica de la solución deben estabilizar a la proteína si los efectos clásicos son dominantes o bien deben ser desestabilizantes si el apareamiento de iones es importante. Está claro, sin embargo, que ni los efectos

de la sal, ni la constante dieléctrica pueden ser interpretados de manera simple, debido a las siguientes razones:

a) Las sales afectan fuertemente al estado desplegado, como veremos más adelante.

b) Los enlaces tipo par iónico (puentes salinos), son generalmente mucho más cortos que la longitud de Debye en soluciones salinas, por lo que la sal debe tener poco efecto sobre la estabilidad del par iónico. Una excepción es el puente salino  $(\text{Glu}2)^- - (\text{Arg}10)^+$  observado en una hélice del péptido C [40], que es apantallado por 1,0 M de sal, aunque esto podría deberse a la separación del par iónico por efectos del solvente.

c) A pesar de que una disminución en la constante dieléctrica dará lugar a un aumento de las interacciones de carga, también disminuirá la ionización total de la molécula debido a que éstas son energéticamente más costosas en un medio dieléctricamente bajo, que en uno alto. Por otra parte, la constante dieléctrica también se correlaciona con otras propiedades del solvente como la hidrofobicidad, por lo que no se trata de un simple diagnóstico de los efectos de las cargas participantes. Por lo tanto, discriminar entre las contribuciones clásicas y el apareamiento electrostático de iones a la estabilidad ha sido una tarea muy difícil.

Durante los años 1930's, el apareamiento de iones se consideró como la principal contribución a la estabilidad de las proteínas [41,42,43]. Mirsky y Pauling sugirieron que el plegamiento está dirigido por el apareamiento iónico de los grupos carboxilo y amino de las cadenas laterales de los aminoácidos. Si el apareamiento de iones es importante para la estabilidad de proteínas, tal estabilidad debe surgir de pares cargados en la superficie de las proteínas, en lugar de pares cargados enterrados en el núcleo de las mismas. La primera evidencia de que algunos



pares iónicos están enterrados en el núcleo de las proteínas fue estudiada en compuestos modelo por Jacobsen y Linderstrom-Lang [44]. Una característica importante de los efectos electrostáticos en solución es un cambio en el volumen ya que el volumen local del agua disminuye en torno a la molécula que incrementa su carga. El campo electrostático de la molécula cargada orienta y ordena los dipolos de agua vecinos (electrostricción), disminuyendo la entropía y el volumen de las moléculas de agua locales. A pH bajo, donde sólo los grupos carboxilo son titulables (es decir son capaces de donar sus hidrógenos ácidos), Jacobsen y Linderstrom-Lang observaron que el volumen de las proteínas aumenta unos  $10 \text{ mLmol}^{-1}$  después de la protonación del grupo  $\text{COO}^-$  para dar  $\text{COOH}$ ; este cambio es el mismo que se observa en los compuestos carboxílicos modelo en el agua, lo que sugiere que los pares iónicos en las proteínas debían estar expuestos.

Estudios más recientes de la estructura de las proteínas conocidas muestran que, efectivamente, pocos pares iónicos están enterrados en el núcleo proteico, en promedio sólo un par iónico por cada 150 residuos de su secuencia está enterrado en la proteína [45]. Esto se desprende de la muy alta energía requerida para transferir un ion desde la solución acuosa hasta el interior de la proteína que es dieléctricamente bajo (los valores oscilan entre  $19 \text{ kcalmol}^{-1}$  para el ion completamente enterrado hasta  $4 \text{ kcalmol}^{-1}$  para un ion medianamente expuesto a la superficie y  $7 \text{ kcalmol}^{-1}$  para el enterramiento completo de un par iónico [46,47]. Por lo tanto, a menos que otras interacciones estén involucradas, en general sólo los pares iónicos de la superficie podrían estabilizar los estados nativos de las proteínas.

Es evidente entonces que el apareamiento de iones puede contribuir a la estabilidad de proteínas. Los estudios de rayos X de las estructuras cristalinas de proteínas conocidas [45,48] muestran que el apareamiento iónico es común en las superficies de estas macromoléculas; además, las variaciones en la secuencia que afectan a dicho apareamiento puede variar la estabilidad de  $1-3 \text{ kcalmol}^{-1}$  entre los pares iónicos [49,50], por ejemplo el puente salino Asp70-His31 en la lisozima del bacteriófago T4 estabiliza a la proteína entre  $3-5 \text{ kcalmol}^{-1}$  [51]. Del mismo modo, sitios de unión de iones diseñados en las proteínas pueden afectar su estabilidad [52]. Sin embargo, es claro que el apareamiento de iones no es la fuerza dominante del plegamiento de las proteínas. La primera prueba de lo anterior, surge del trabajo pionero de Jacobsen y Linderstrom-Lang [44], quienes interpretaron los modelos de Eyring y Stearn [43] y Mirsky y Pauling [42] de la siguiente forma: si un hidrógeno protona a un grupo carboxilo ( $-\text{COO}^-$ ) formando la especie  $-\text{COOH}$  en el estado desplegado, entonces tanto el grupo carboxilo como el grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) se encuentran sin carga y por tanto incapaces de interactuar entre ellos; por otra parte si el hidrógeno protona a un grupo amino formando la especie  $-\text{NH}_3^+$  en el estado plegado, entonces el grupo carboxilo ( $-\text{COO}^-$ ) y amino ( $-\text{NH}_3^+$ ) formarán un par iónico. Jacobsen y Linderstrom-Lang supusieron que las cargas se mantienen solvatadas durante el plegamiento.

Estudios con compuestos modelo muestran que la protonación de  $\text{NH}_2$  a  $\text{NH}_3^+$  lleva a una electrostricción de alrededor de  $-4 \text{ mLmol}^{-1}$  y que la deprotonación  $\text{COOH}$  a  $\text{COO}^-$  produce  $-10 \text{ mLmol}^{-1}$ , como se señaló anteriormente. El plegamiento entonces da lugar a un cambio de volumen de  $-14 \text{ mLmol}^{-1}$  por cada par iónico. En contraste con este modelo, los experimentos muestran que el

plegamiento conduce a un aumento en el volumen [44, 53,54,55]. También incompatible con el apareamiento de iones como la fuerza dominante del plegamiento está la observación de que la estabilidad de las proteínas muestra poca dependencia con el pH o la sal a bajas concentraciones y cerca del punto isoeléctrico [56,57,58,59]. Incluso, para algunas proteínas, el pH de máxima estabilidad no coincide con el punto isoeléctrico, pero esto puede ser considerado en el modelo clásico por el enterramiento de algunos de los grupos protonables en el núcleo apolar de las proteínas (a menudo residuos de histidina) [34]. Como una prueba más de que la carga por lo general sólo contribuye débilmente a la estabilidad de las proteínas, Hollecker y Creighton [60] encontraron poco efecto de los cambios de las cargas de diversos grupos de aminoácidos en tres proteínas diferentes.

En tercer lugar, quizás la evidencia más convincente de que el apareamiento de iones no es la fuerza dominante del plegamiento proviene de los estudios estructurales de Barlow y Thornton [45]. Estos autores han observado que los pares iónicos no están altamente conservados en la evolución, pero más importante aún es su observación sobre el número de pares iónicos en las proteínas pequeñas que es alrededor de cinco pares iónicos por cada 150 residuos y en promedio uno de ellos está enterrado. Entonces, es poco probable que una interacción que involucre sólo diez residuos (menos del 10% de la molécula), pudiera ser la fuerza dominante del plegamiento de las proteínas. Usando un estimado de  $1-3 \text{ kcal mol}^{-1}$  para la estabilización por par iónico se ha obtenido un valor para la estabilización de entre  $5-15 \text{ kcal mol}^{-1}$  [49,50]. A pesar de que el apareamiento de iones puede por lo tanto contribuir con una energía libre igual a la de la estabilidad neta de la proteína, esto es todavía 5 a 10

veces más pequeño que la contribución de las interacciones hidrofóbicas que se discuten más adelante.

Un estimado similar, de alrededor de  $10 \text{ kcal mol}^{-1}$  de estabilización debido al apareamiento de iones, se ha realizado por el grupo de Gurd [30,61]. Estos autores observaron una disminución de la estabilidad de la ferromioglobina del cachalote con un aumento en la concentración de la sal, hecho que fue interpretado como una prueba del apareamiento de iones. Estos autores asumieron que la sal afecta predominantemente al estado nativo, basados en la diferencia del comportamiento en la titulación de los estados nativo y desnaturalizado. Sin embargo, estos resultados no implican necesariamente que la estabilización electrostática provenga del apareamiento de iones. La sal puede afectar a la energía libre relativa de forma diferente a como afecta el comportamiento en la titulación. Un modelo polielectrolítico de proteínas [34] muestra que el aumento de la sal, solamente por efectos clásicos, reducirá la energía libre electrostática del estado desplegado de la mioglobina más que la del estado plegado. Al aumentar las pantallas salinas, las repulsiones de carga en la molécula desplegada son más eficientes que en la molécula plegada a pH bajo, probablemente debido a la mejor interacción de la solución salina con la molécula desplegada. El modelo es coherente con una observación experimental adicional que es otra cosa difícil de explicar únicamente con base en el apareamiento iónico.

Experimentos similares a los efectuados con la mioglobina por Friend y Gurd fueron desarrollados por Goto y Fink [62] con la beta-lactamasa y señalan que la sal desestabiliza el estado nativo cuando la molécula de proteína está altamente cargada a pH bajo, pero también encontraron que estabiliza a la estructura nativa cuando la

proteína adquiere carga a pH básico. Se ha predicho que una fracción de la energía libre electrostática surgirá de la entropía generada por la liberación de protones [34,35], en lugar de solamente por la energética de las cargas.

### 3.1. El puente de hidrógeno

Un puente de hidrógeno resulta de la interacción dipolo-dipolo entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido al nitrógeno, oxígeno o flúor presente en una molécula (por ejemplo:  $\text{-O}\cdots\text{H-O-}$ ; la línea punteada indica al puente de hidrógeno). Por lo tanto, el nombre de *puente del hidrógeno*, no debe confundirse con el enlace covalente de hidrógeno, como los que existen en la molécula del agua ( $\text{H-O-H}$ ). La energía de un puente del hidrógeno es típicamente de 5 a 30  $\text{kJmol}^{-1}$ . Estos enlaces pueden producirse entre moléculas (*puentes de hidrógeno intermoleculares*), o bien entre diferentes partes de una sola molécula (*puentes de hidrógeno intramoleculares*). El puente de hidrógeno es un enlace dipolo-dipolo muy fuerte del tipo van der Waals-Keesom, como veremos más adelante, pero más débil que los enlaces covalentes iónicos y metálicos (un enlace covalente típico es alrededor de veinte veces más fuerte que un puente del hidrógeno intermolecular).

La magnitud de un puente de hidrógeno se encuentra entre la de un enlace covalente y una atracción electrostática intermolecular. Este tipo de enlace se presenta tanto en moléculas inorgánicas como el agua y las orgánicas como los ácidos nucleicos y las proteínas. Los puentes de hidrógeno intermoleculares son los responsables del punto de ebullición del agua a  $100^\circ\text{C}$ , debido a su fuerza

y a diferencia de la que presentan otros hidruros. Los puentes de hidrógeno intramoleculares son en parte responsables de la estructura tridimensional de las proteínas (léase de la estabilización de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria) y de los ácidos nucleicos.

### 3.2. El enlace de hidrógeno

Un átomo de hidrógeno unido con un átomo relativamente electronegativo, generalmente oxígeno, nitrógeno o flúor, es un donador de puente de hidrógeno [63]. Estos átomos electronegativos son aceptores de puente de hidrógeno, independientemente de si están unidos a un átomo de hidrógeno o no. Un ejemplo de donador de puentes de hidrógeno es el etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), pues tiene un átomo de hidrógeno unido a uno de oxígeno; un ejemplo de aceptor de puentes de hidrógeno que no tiene un átomo de hidrógeno unido a un átomo de oxígeno es el éter dietílico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).

El carbono también puede participar en la formación de puentes de hidrógeno, especialmente cuando el átomo de carbono está unido a varios átomos electronegativos, como en el caso de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ). El átomo electronegativo atrae a la nube de electrones que se encuentra alrededor del núcleo del hidrógeno y, mediante la polarización de la nube, deja al átomo de hidrógeno con una carga parcial positiva. Debido al pequeño tamaño del átomo de hidrógeno en relación con otros átomos y moléculas, la carga resultante aunque sólo es parcial, representa una densidad de carga elevada. Un puente del hidrógeno se forma cuando esta elevada densidad positiva atrae a un par de electrones aislado en otro heteroátomo, convirtiéndose en el aceptor de dicho

puente, el cual es a menudo descrito como una interacción electrostática tipo dipolo-dipolo; sin embargo, también presenta algunas características del enlace covalente como la direccionalidad y la fuerza, produce distancias interatómicas más cortas que la suma de los radios de van der Waals y, por lo general, implica un número limitado de participantes de la interacción, lo que puede interpretarse como una especie de valencia. Estas características covalentes son más importantes cuando los aceptores unen hidrógenos de donadores más electronegativos.

La naturaleza parcialmente covalente de un enlace del hidrógeno plantea las siguientes preguntas: ¿a qué molécula o átomo pertenece el núcleo del hidrógeno? y ¿cuál de los participantes debe ser etiquetado como donador y cuál como aceptor?. Por lo general, esto es fácil de determinar simplemente basándose en las distancias interatómicas del sistema  $X-H \cdots Y$ ; la distancia típica de  $X-H$  es  $\sim 1.1 \text{ \AA}$ , mientras que la distancia  $H \cdots Y$  es  $\sim 1.6$  a  $2.0 \text{ \AA}$ .

Los puentes de hidrógeno pueden variar en la magnitud de su fuerza y van desde los muy débiles ( $1-2 \text{ kJmol}^{-1}$ ) a los muy fuertes ( $> 155 \text{ kJmol}^{-1}$ ), como en el ion  $HF^2-$  [64]: los valores típicos de esta interacción son:

- $F-H \cdots F$  ( $155 \text{ kJmol}^{-1}$ ).
- $O-H \cdots N$  ( $29 \text{ kJmol}^{-1}$ ).
- $O-H \cdots O$  ( $21 \text{ kJmol}^{-1}$ ).
- $N-H \cdots N$  ( $13 \text{ kJmol}^{-1}$ ).
- $N-H \cdots O$  ( $8 \text{ kJmol}^{-1}$ ).
- $HO-H \cdots OH_2$  ( $7.9 \text{ kJmol}^{-1}$ ) [65].
- $HO-H \cdots OH_3^+$  ( $18 \text{ kJmol}^{-1}$ ) [65].

La longitud de los puentes de hidrógeno depende de la fuerza del enlace, la temperatura y la presión. La fuerza

del enlace es dependiente de la temperatura, la presión, el ángulo del enlace y el ambiente (que se caracteriza por lo general por la constante dieléctrica local). La longitud típica de un puente del hidrógeno en el agua es  $1.97 \text{ \AA}$ . El ángulo ideal del puente de hidrógeno depende de la naturaleza del donador del hidrógeno. Resultados experimentales del ácido fluorhídrico como donador con diversos receptores muestran los ángulos que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1

Aceptor $\cdots$ Donador	Simetría VSEPR*	Ángulo ( $^\circ$ )
$HCN \cdots HF$	Lineal	180
$H_2CO \cdots HF$	Trigonal planar	110
$H_2O \cdots HF$	Piramidal	46
$H_2S \cdots HF$	Piramidal	89
$SO_2 \cdots HF$	Trigonal planar	145

Los valores fueron tomados de [66]. \* Por sus siglas en inglés: *Valence shell electron pair repulsion*, una serie de reglas que los químicos usan para predecir la forma de una molécula.

### 3.3. Historia del estudio del puente de hidrógeno

En su libro *La naturaleza del enlace químico*, Linus Pauling otorga créditos a T. S. Moore y T. F. Winnill como los primeros autores que mencionaron la existencia del puente de hidrógeno [67]. Ellos usaron el enlace del hidrógeno para explicar el hecho de que el hidróxido

de trimetilamonio es una base más débil que el hidróxido de tetrametilamonio. La descripción del puente de hidrógeno en su más conocida participación (en el agua) llegó años más tarde, en 1920, y fue realizada por Latimer y Rodebush [68].

### 3.4. Puentes de hidrógeno en el agua

El más ubicuo, y quizás más simple, ejemplo del puente de hidrógeno se encuentra entre las moléculas de agua. Una molécula de agua está compuesta de dos átomos de hidrógeno y un átomo de oxígeno. Dos moléculas de agua pueden formar puentes de hidrógeno entre ellas, el caso más sencillo cuando sólo dos moléculas están presentes, se llama el dímero de agua y se utiliza a menudo como un sistema modelo. Cuando más moléculas están presentes, como es el caso del agua en estado líquido, más puentes son posibles de establecer porque el oxígeno de una molécula de agua tiene dos pares de electrones aislados, cada uno de los cuales puede formar un puente de hidrógeno con los átomos de hidrógeno de otras dos moléculas de agua. Es posible repetir esta situación de modo que cada molécula de agua puede unirse por medio de puentes de hidrógeno a un máximo de otras cuatro moléculas de agua (dos a través de sus dos pares de electrones aislados y dos más a través de sus dos átomos de hidrógeno).

El elevado punto de ebullición de agua líquida ( $100^{\circ}\text{C}$ ) se debe al gran número de puentes de hidrógeno que cada molécula de agua puede tener en relación con su baja masa molecular, y sin olvidar la gran fuerza que éstos ejercen en el sistema. En realidad la molécula de agua tiene un muy alto punto de ebullición, punto de fusión

( $0^{\circ}\text{C}$ ) y viscosidad en comparación con otras sustancias similares no conectadas por puentes de hidrógeno (la viscosidad del agua a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C}$ ) es de 0.0100 poises, mientras que en su punto de ebullición ( $100^{\circ}\text{C}$ ) disminuye hasta 0.028 poises). La explicación de estos atributos es la incapacidad o dificultad para romper los puentes de hidrógeno. La molécula de agua es muy peculiar, ya que su átomo de oxígeno tiene dos pares de electrones aislados y dos átomos de hidrógeno, lo que significa que el número total de puentes de hidrógeno de una molécula de agua es de hasta cuatro. Por ejemplo, el fluoruro de hidrógeno (HF) que tiene tres pares de electrones aislados en el átomo de F, y un solo átomo de hidrógeno, puede intervenir únicamente en la formación de dos puentes de hidrógeno en total; el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) presenta la situación opuesta: tres átomos de hidrógeno, pero sólo un par de electrones aislados.

El número exacto de puentes de hidrógeno en el que una molécula de agua participa en el estado líquido, fluctúa con el tiempo y depende de la temperatura. A partir de simulaciones computacionales del agua líquida a  $25^{\circ}\text{C}$ , se ha calculado que cada molécula de agua participa en un promedio de 3.59 puentes de hidrógeno. Por el contrario, a  $100^{\circ}\text{C}$ , este número se reduce a 3.24, debido al aumento de movimiento molecular y a la disminución de la densidad; a  $0^{\circ}\text{C}$  el número medio de enlaces de hidrógeno aumenta a 3.69 [69]. En un estudio más reciente se encontró un número mucho menor de puentes de hidrógeno: 2.36 a  $25^{\circ}\text{C}$  [70]. Las diferencias pueden deberse a la utilización de un método distinto para definir y contar los puentes de hidrógeno.

Cuando la fuerza del puente de hidrógeno es equivalente entre dos moléculas de agua, se puede encontrar que los átomos de dichas moléculas están divididos en

dos iones poliatómicos de carga opuesta, específicamente el ion hidróxilo ( $\text{OH}^-$ ) y el ion hidronio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ), que también es conocido como ion oxonio.

De hecho, en el agua pura en condiciones normales de temperatura y presión, esta última formulación es aplicable sólo en raras ocasiones, en promedio, alrededor de una de cada  $5.5 \times 10^8$  moléculas de agua cede un protón a otra molécula de agua, de acuerdo con el valor de la constante de disociación del agua en esas condiciones. Esto es un fenómeno esencial que contribuye a la singularidad del agua.

### 3.5. Los puentes de hidrógeno en las proteínas y el ADN

El puente de hidrógeno juega un papel importante en la determinación de la estructura tridimensional que adoptan las proteínas y los ácidos nucleicos y que determina su función. En estas macromoléculas, la unión entre las partes de la misma causa un plegamiento específico que ayuda a determinar el papel fisiológico o bioquímico de la molécula. La estructura de la doble hélice del ADN, por ejemplo, se debe en gran medida a los puentes de hidrógeno entre los pares de bases que unen una hebra complementaria con la otra y además permiten el proceso de replicación que mantiene la continuidad de la información genética a través de las generaciones.

En las proteínas, los puentes de hidrógeno se forman principalmente entre los átomos de oxígeno de los grupos carboxilo y los hidrógenos de las amidas que forman el esqueleto polipeptídico. Cuando los puentes de hidrógeno en la cadena polipeptídica se forman entre residuos de aminoácidos que están cercanos en la estructura

primaria, es decir la secuencia lineal de los residuos (a distancia  $n$  y  $n + 4$ ), se produce un arreglo espiral repetitivo de la cadena formando la estructura secundaria más común en las proteínas, denominada alfa hélice. Existe una variación de esta situación helicoidal y sucede cuando la distancia entre los puentes de hidrógeno en la cadena polipeptídica es menor, es decir entre las posiciones  $n$  y  $n + 3$ , lo cual da origen a una estructura más compacta denominada alfa hélice  $\beta_{10}$ . Cuando dos segmentos de la cadena polipeptídica que se encuentran distantes en secuencia se unen por medio de puentes de hidrógeno, el arreglo que se forma es plano y se denomina como una hoja beta, que es otro tipo de estructura secundaria presente en las proteínas; si ambas cadenas tienen dirección hacia el extremo amino o carboxilo de la proteína, la hoja beta es paralela, si por el contrario una hebra va en el sentido del extremo carboxilo y la otra en el sentido del amino (o viceversa), la hebra se denomina antiparalela. En las proteínas, los puentes de hidrógeno también se producen entre los donadores y aceptores del puente de hidrógeno presentes en las cadenas laterales de los residuos polares. Esta situación es de vital importancia para dar lugar al siguiente nivel estructural de las proteínas, que es la estructura terciaria.

La estructura terciaria es para muchas proteínas equivalente al estado nativo o funcional de las mismas; para aquellas proteínas que están formadas por más de una cadena polipeptídica, se dice que presentan estructura cuaternaria; en la formación de ésta también están involucrados los puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos polares. Como parte de su estructura en muchas proteínas se encuentran ciertas moléculas de agua que se denominan moléculas de agua estructurales, las cuales forman puentes de hidrógeno con ellas

mismas formando largas cadenas o bien, con las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos polares en la cadena del polipéptido. Esta situación refleja el hecho de que la estructura tridimensional funcional de las proteínas está íntimamente relacionada con el ambiente en donde se pliegan y que generalmente es agua. Por ejemplo, el arreglo de la estructura tridimensional de las proteínas globulares está diseñado de tal forma que los residuos polares o cargados en su mayoría están expuestos al solvente, lo que permite que puedan realizar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua del solvente que las contiene. Por otra parte, la mayoría de los residuos apolares se encuentran en el interior de la proteína, formando un núcleo hidrofóbico, situación que refleja la incapacidad de estos residuos para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua del solvente (ver la sección del efecto hidrofóbico).

Finalmente hay que mencionar que, con relación a las enzimas, diversas reacciones que catalizan requieren en muchos casos de la formación de interacciones con el sustrato a transformar; sobre todo cuando se trata de transformaciones de sustratos polares, se generan puentes de hidrógeno entre los residuos del sitio catalítico y la molécula del sustrato.

#### 4. LAS FUERZAS DE VAN DER WAALS

La ecuación de van der Waals es una ecuación de estado que puede derivarse de una forma especial de los potenciales entre un par de moléculas (repulsiones de esfera dura y atracción de van der Waals) como  $R^{-6}$ . En fisicoquímica, las fuerzas o interacciones de van der Waals, denominadas así en honor al científico alemán

Johannes Diderik van der Waals, son la fuerza atractiva o repulsiva entre las moléculas o entre partes de la misma molécula, que no se deben a los enlaces covalentes o a las interacciones electrostáticas de iones entre sí o con moléculas neutras. Estas relaciones incluyen:

- interacciones dipolo permanente - dipolo permanente.
- interacciones dipolo permanente - dipolo inducido.
- interacciones instantáneas dipolo inducido - dipolo inducido (fuerzas de dispersión de London).

Las fuerzas van der Waals son relativamente débiles en comparación con los enlaces químicos normales, pero desempeñan un papel fundamental en campos tan diversos como la química supramolecular, la biología estructural, la ciencia de polímeros, la nanotecnología, la ciencia de superficies y física de la materia condensada. Definen también las características químicas de muchos compuestos orgánicos y la solubilidad de sustancias orgánicas en medios polares y no polares. En alcoholes de cadena corta por ejemplo, las propiedades polares del grupo hidroxilo dominan a las débiles fuerzas intermoleculares de van der Waals. Por el contrario en alcoholes de cadena larga las propiedades de la cadena apolar alquilo (R) dominan y definen la solubilidad. Las fuerzas de van der Waals aumentan con la longitud de la parte no polar de la sustancia involucrada.

##### 4.1. Definición

Las fuerzas de van der Waals son atracciones entre átomos, moléculas y superficies. Difieren de los enlaces covalentes y iónicos en el sentido de que son causadas por

correlaciones en la fluctuación de las polarizaciones de las partículas cercanas, como consecuencia de la dinámica cuántica.

Las fuerzas intermoleculares están formadas por cuatro componentes principales. En general un potencial intermolecular tiene un componente repulsivo que impide el colapso de las moléculas, porque al acercarse como entidades estas repulsiones dominan el proceso. También tienen un componente atractivo, que a su vez, consta de tres contribuciones:

1. Las interacciones electrostáticas entre las entidades cargadas (en el caso de iones moleculares), dipolos (en el caso de moléculas sin centro de inversión), cuadrupolos (todas las moléculas con simetría inferior a la cúbica) y en general, entre multipolos permanentes. La interacción electrostática a veces se denomina como interacción o fuerza de Keesom en honor a Willem Hendrik Keesom.

2. La segunda fuente de atracción es la inducción (también conocida como la polarización), que es la interacción entre un multipolo permanente en una molécula con un multipolo inducido en otra. Esta interacción es a menudo medida en debyes en honor de Peter J. W. Debye.

3. La tercera fuente de atracción son las fuerzas de London o de dispersión. Ésta es la única atracción que experimentan las entidades no polares, pero es operativa entre cualquier par de moléculas, independientemente de su simetría.

Existen discrepancias en la literatura sobre las fuerzas de van der Waals, pues algunos autores las incorporan a la totalidad de las interacciones, incluyendo la repulsión, otros se refieren únicamente a las fuerzas de atracción, mientras que otros más las usan como sinónimo de las fuerzas de London, por lo cual es importante entender

a qué se refiere cada autor. Todas las fuerzas intermoleculares de van der Waals son anisotrópicas (excepto aquellas entre dos átomos de un gas noble), lo que significa que dependen de la orientación relativa de las moléculas.

Las interacciones de inducción y de dispersión son siempre atractivas, independientemente de su orientación, pero los cambios en la interacción electrostática se llevan a cabo después de los cambios de rotación de las moléculas; es decir, las fuerzas electrostáticas pueden ser atractivas o repulsivas, dependiendo de la orientación mutua de las moléculas.

Cuando las moléculas están en movimiento térmico, como cuando se encuentran en la fase líquida o gaseosa, las fuerzas electrostáticas están muy por arriba del promedio, porque las moléculas rotan térmicamente y, por tanto, censan tanto las partes repulsivas como atractivas de la fuerza electrostática. A veces, este efecto se manifiesta por la afirmación de que "el movimiento térmico aleatorio a la temperatura ambiente puede usualmente superarlas o perturbarlas", lo que se refiere al componente electrostático de las fuerzas de van der Waals. Evidentemente, el efecto térmico promedio es mucho menos pronunciado para la inducción atractiva y las fuerzas de dispersión.

El potencial de Lennard-Jones se utiliza a menudo como un modelo aproximado para la parte isotrópica del total de las fuerzas de van der Waals (repulsión más atracción) como función de la distancia. Las fuerzas de van der Waals son responsables en algunos casos del aumento por presión de las líneas espectrales y de la formación de moléculas tipo van der Waals.



#### 4.2. Las fuerzas de dispersión de London

Las fuerzas de dispersión de London, se denominan así en honor al físico germano-americano Fritz London y son interacciones intermoleculares débiles que surgen de la relación entre multipolos temporales en moléculas sin momentos multipolares permanentes. Las fuerzas de dispersión de London también se conocen como fuerzas de London o fuerzas tipo dipolo inducido-dipolo y pueden ser exhibidas por moléculas no polares porque la densidad de electrones se mueve probabilísticamente alrededor de una molécula.

Existe una alta probabilidad de que la densidad de electrones no se distribuya uniformemente a lo largo de una molécula no polar. Cuando los electrones se ordenan de forma desigual se desarrolla un multipolo temporal que puede interactuar con otros multipolos cercanos e inducir una polaridad similar temporal en las moléculas cercanas. Las fuerzas de London también están presentes en moléculas polares, pero son sólo una pequeña parte del total de las fuerzas de interacción.

La densidad de electrones en una molécula puede ser redistribuida por la proximidad a un multipolo. Los electrones se reunirán en el lado de la molécula que se enfrenta a una carga positiva y se retirarán de una carga negativa. Por lo tanto, un multipolo transitorio puede ser producido por una molécula polar cercana, o incluso por un multipolo instantáneo en otra molécula no polar. En el vacío, las fuerzas de London son más débiles que otras fuerzas intermoleculares como las interacciones iónicas, el puente de hidrógeno o las interacciones permanentes dipolo-dipolo. Este fenómeno es la única fuerza atractiva intermolecular a grandes distancias que se presenta entre átomos neutros (por ejemplo un gas noble), y es la prin-

cipal fuerza atractiva entre moléculas no polares (como nitrógeno o metano). Sin las fuerzas de London, no habría interacciones atractivas entre los átomos de un gas noble y no existirían en forma líquida. Las fuerzas de London se vuelven más fuertes a medida que el átomo o molécula en cuestión se hace más grande. Esto se debe al incremento de la polarizabilidad de moléculas con nubes electrónicas más grandes y más dispersas. Esta tendencia se ejemplifica muy bien por los halógenos, familia VIIA de la tabla periódica. Tanto el flúor como el cloro son gases a temperatura ambiente, mientras que el bromo es un líquido y el yodo es un sólido. Las fuerzas de London también se vuelven más fuertes a medida que la cantidad de superficie de contacto aumenta. Una mayor área de superficie produce una interacción más estrecha entre las diferentes moléculas.

En las proteínas existen varias cadenas de aminoácidos apolares que son susceptibles de sufrir polarizabilidad, dando lugar a dipolos inducidos instantáneos. Dado que existe una frontera entre el núcleo hidrofóbico de estas macromoléculas y la capa hidrofílica en el exterior, la probabilidad de que este tipo de interacciones participe activamente en la estabilización del estado nativo es sumamente amplia.

#### 5. EL EFECTO HIDROFÓBICO

El efecto hidrofóbico es la propiedad que presentan las moléculas no polares para formar agregados intermoleculares en un medio acuoso [71]. El nombre surge de la combinación de las palabras griegas *agūa* (*hidros*) y temor (*phobos*), que describe la aparente repulsión entre el agua y los hidrocarburos. A nivel macroscópico, el efecto

hidrofóbico es evidente cuando el aceite y el agua se tratan de mezclar a temperatura ambiente [72] y forman fases separadas o bien cuando rebota el agua sobre las superficies hidrofóbicas, tales como las de las hojas cerosas presentes en muchas plantas, o la superficie de los automóviles que recientemente se enceró. A nivel molecular, el efecto hidrofóbico es una importante fuerza motriz para formar y mantener la estructura de las proteínas, es decir de su plegamiento, también obviamente de las interacciones proteína-proteína (en los oligómeros), la formación de bicapas lipídicas en las membranas biológicas, la estructura de los ácidos nucleicos y las interacciones entre las enzimas o proteínas de transporte y las moléculas pequeñas que son sus ligandos. Según la teoría solvofóbica de la cromatografía en fase reversa (RPC), el efecto hidrofóbico está impulsado por la pérdida de puentes de hidrógeno y el muy elevado costo entrópico que se genera por la formación de una cavidad en torno a las moléculas no polares [73]. Estas pérdidas pueden ser minimizadas al forzar a las moléculas no polares a mantenerse juntas (ver más adelante).

### 5.1. Anfífilos

Los anfífilos son moléculas que poseen dominios tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Los detergentes se componen de moléculas anfífilas que solubilizan a las moléculas hidrofóbicas en el agua, gracias a la formación de micelas y bicapas (como en las burbujas o pompas de jabón). Estas propiedades son también importantes para la formación y función de las membranas celulares, las cuales están compuestas principalmente de fosfolípidos que impiden al medio acuoso del interior de una célula

mezclarse con el agua externa. Obviamente desde este punto de vista, las proteínas pueden considerarse como moléculas de este tipo, pues en su mayoría están formadas por aminoácidos con cadenas laterales tanto apolares como polares, lo que les permite empaquetarse en el solvente que las contiene.

### 5.2. En el plegamiento de las proteínas

En el caso del plegamiento de las proteínas, el efecto hidrofóbico es importante para comprender la estructura de estas macromoléculas que están formadas, en parte, por aminoácidos hidrofóbicos como alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y metionina y que generalmente se agrupan juntos en el núcleo de la proteína. La mayoría de las proteínas globulares plegadas tienen un núcleo hidrofóbico en el que se han empaquetado las cadenas laterales hidrofóbicas, esta situación estabiliza la formación y mantenimiento del estado nativo o plegado; hay que dejar bien claro, que esto tiene sus excepciones y podemos encontrar proteínas con núcleos hidrofóbicos que contienen también cadenas laterales de aminoácidos polares y, como se mencionó antes, incluso puentes salinos, siendo estas interacciones de lo más específicas y por tanto juegan un papel preponderante, tanto en la estructura y función de la macromolécula, como en su estabilidad.

Por otra parte, la mayoría de las cadenas laterales hidrofílicas en las proteínas globulares se encuentran en la superficie de la macromolécula, en contacto con el solvente que por lo general es agua y haciendo puentes de hidrógeno con ella; para esta situación existen también contraejemplos, como todas aquellas proteínas que

tienen un sitio de reconocimiento para moléculas apolares (sean enzimas o transportadoras) expuesto al solvente. Actualmente se acepta de forma general que el reducir al mínimo el número de cadenas laterales hidrofóbicas expuestas al solvente es la principal fuerza motriz detrás del proceso de plegamiento de las proteínas [74], aunque no se descarta que está involucrado el reordenamiento de los puentes de hidrógeno en la misma macromolécula y con el solvente [75]. Para el material genético, en la formación de la estructura helicoidal del ADN, están involucrados por una parte la formación de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina), así como el apilamiento de las partes aromáticas de las mismas, promovido por situaciones hidrofóbicas.

### 5.3. Termodinámica del efecto hidrofóbico

La energía libre de transferencia de moléculas no polares desde un disolvente no polar hacia un disolvente acuoso se utiliza a menudo para cuantificar el efecto hidrofóbico. La energía libre de transferencia ( $\Delta G_{\text{transferencia}}$ ) de una molécula hidrofóbica en estas condiciones al agua es positiva. La  $\Delta G_{\text{transferencia}}$  puede ser expresada como la suma de dos componentes, la entalpía de transferencia ( $\Delta H_{\text{transferencia}}$ ) y el componente entrópico influenciado por la temperatura ( $T\Delta S_{\text{transferencia}}$ ) de acuerdo a la relación termodinámica denominada  $G = H - TS$ . A temperatura ambiente, la  $\Delta H_{\text{transferencia}}$  es aproximadamente cero y el producto  $T\Delta S_{\text{transferencia}}$  es negativo. En otras palabras, el efecto hidrofóbico está entrópicamente dirigido a temperatura ambiente.

La otra característica termodinámica del efecto hidrofóbico, es el cambio en la capacidad calorífica de transferencia,  $\Delta C_{p,i}$ , que tiene un valor positivo, en contraste con el valor negativo observado en la transferencia de una molécula hidrofílica. Otra forma de entender el efecto hidrofóbico es por ejemplo observar lo que ocurre al introducir una sustancia hidrofóbica en el agua. Las moléculas en el agua pura adoptan una estructura en la cual se maximiza la entropía (S). El incluir una molécula hidrofóbica en el agua pura perturba su estructura y disminuye la entropía del sistema al crear una "cavidad" en el agua, ya que por su naturaleza la molécula hidrofóbica es incapaz de interactuar con las moléculas de agua de forma electrostática. Cuando más de una cavidad está presente, el trastorno en la estructura se incrementa, lo que significa que hay menos moléculas de agua libres. Para contrarrestar esta situación, las moléculas de agua obligan a las moléculas hidrofóbicas a permanecer juntas, lo que produce algo así como una "jaula" de agua en torno a ellas. Esta "jaula" tendrá una menor superficie que la superficie total de las cavidades. Esto maximiza la cantidad de agua libre y, por tanto, la entropía. Entonces, el efecto hidrofóbico también podría ser entendido como la "lipofobicidad" del agua. A altas temperaturas ( $\sim 110^\circ\text{C}$ ) estas jaulas ya no son más fuertes que la mayor parte del agua, y la contribución de la entropía tiende a cero. Sin embargo, ahora la entalpía de la transferencia es positiva; es decir, desfavorable. Debido a que la dependencia de la entropía y la entalpía con la temperatura no es la misma, hay cierta temperatura a la que el efecto hidrofóbico es más fuerte, disminuyendo a temperaturas por encima y por debajo de ésta.

La disminución en la fuerza del efecto hidrofóbico con la disminución de la temperatura es probablemente la principal causa de la desnaturalización de las proteínas por frío.

La contribución del efecto hidrofóbico a la estabilidad de las proteínas globulares se ha estimado empíricamente tanto por la cuantificación de la termodinámica de transferencia de compuestos modelo (por ejemplo, aminoácidos bloqueados para formar determinadas interacciones, péptidos cíclicos, etcétera), de disolventes orgánicos al agua, y por estudios de mutagénesis sitio dirigida en las proteínas. El número obtenido es usualmente función del cambio en el área accesible al solvente (ASA) de la superficie no polar, al realizar la transformación del estado desplegado al plegado o nativo. Los estudios con compuestos modelo predicen que el efecto hidrofóbico al exponer a un grupo metileno desde el solvente apolar puro al agua, es de  $0.8 \text{ kcalmol}^{-1}$  [76]. Los estudios de mutagénesis sitio dirigida proveen de un valor mayor y con una variación estadística incrementada: el efecto hidrofobo promedio estimado por mutagénesis sitio dirigida para un grupo metileno enterrado en la proteína al agua es de alrededor de  $1.3 \text{ kcalmol}^{-1}$ . Sin embargo, cuando los resultados obtenidos por mutagénesis sitio dirigida del metileno se grafican como función del tamaño de la cavidad creada por la sustitución de los residuos, la extrapolación a cero predice una cavidad cuyo tamaño es de  $0.8 \text{ kcalmol}^{-1}$ , de acuerdo con el valor encontrado para la transferencia de compuestos modelo desde el octanol hacia el agua (revisado en [74]).

En los estudios de mutagénesis sitio dirigida, las cavidades creadas por la sustitución de los residuos tienen un efecto desestabilizador adicional: la pérdida de interacciones favorables de van der Waals (en comparación con los presentes en la proteína silvestre). Por lo tanto, el "efecto hidrofóbico" medido por mutagénesis sitio dirigida incluye tanto un componente entrópico debido al ordenamiento del disolvente, como uno principalmente

entálpico debido a la pérdida de contactos dentro de la proteína.

## 6. LA ENTROPÍA CONFORMACIONAL

La entropía conformacional es la entropía asociada con la disposición compacta o globular que una cadena polimérica asume en solución. El concepto es más comúnmente aplicado a las macromoléculas biológicas tales como las proteínas y el ARN, pero también puede ser utilizado para los polisacáridos y otros compuestos orgánicos poliméricos. Para calcular la entropía conformacional, las posibles conformaciones asumidas por el polímero en primer lugar deben ser discretas en un número finito de estados, por lo general caracterizados por combinaciones únicas de ciertos parámetros estructurales, a cada uno de los cuales se ha asignado un nivel energético particular. En las proteínas, los ángulos dihedros ( $\phi$  y  $\psi$ ) y los rotámeros de las cadenas laterales son comúnmente utilizados como los descriptores; para el ARN se toma en cuenta la secuencia de pares de bases. Estas características se utilizan para definir los grados de libertad, que en la mecánica estadística censan los posibles "microestados" del sistema. La entropía conformacional asociada con una conformación particular es entonces dependiente de la probabilidad asociada con la ocupación de ese estado, según lo determinado por la suma de las energías asociadas con el valor de cada uno de los parámetros asumidos en el estado.

La entropía de las proteínas con estructura al azar (*random coil*) o bien las desnaturalizadas es significativamente más alta que la de la proteína plegada en el estado nativo. En particular, se piensa que la entropía conformacional

de las cadenas laterales de los aminoácidos en las proteínas es un contribuyente importante para la estabilización energética del estado desnaturalizado y, por lo tanto, un obstáculo para el plegamiento de las proteínas [77]. Sin embargo, se ha demostrado que la entropía conformacional de las cadenas laterales puede también estabilizar preferencialmente a la estructura nativa, entre otras estructuras compactas alternativas [78]. La entropía conformacional del ARN y las proteínas puede ser estimada, por ejemplo, a través de métodos empíricos para estimar la pérdida de entropía conformacional, en particular de una cadena lateral en una proteína plegada; estos métodos pueden predecir aproximadamente los efectos de una mutación puntual particular en una proteína. La entropía conformacional de las cadenas laterales puede definirse como un muestreo de Boltzmann de todos los posibles estados rotaméricos en el sistema [79]. La limitada gama de conformaciones de los residuos de prolina reduce la entropía conformacional del estado desnaturalizado y aumenta la diferencia de energía entre éste y el estado nativo. Se ha observado una correlación entre la termoestabilidad de una proteína y su contenido de residuos de prolina [80].

## 7. CONSIDERACIONES FINALES

Los avances en el estudio de la estabilización del estado nativo de las proteínas sugiere que la hidrofobicidad es la fuerza dominante de este proceso, entendiendo que el término hidrofóbico es definido operacionalmente en términos de los estudios de la transferencia de aminoácidos con cadenas laterales no polares del agua a un medio no polar y preferentemente que sea capaz de formar

puentes de hidrógeno. Se reconoce la importancia en el proceso de otras interacciones, pero éstas son definitivamente mucho más débiles; aún así, pueden intervenir en la estabilización de la macromolécula. En medios ácidos o alcalinos, las repulsiones de la carga electrostática generadas en las proteínas desestabilizan a las estructuras nativas; pero cerca de un pH neutro ( $\sim 7.0$ ), el apareamiento iónico puede estabilizar a las proteínas. Existe evidencia de que los puentes de hidrógeno o las interacciones de van der Waals entre los aminoácidos polares pueden ser importantes, pero su participación es todavía entendida pobremente.

Una contribución importante a la estructura y la estabilidad de las proteínas, es la fuerza de oposición, que proviene principalmente de la pérdida de la entropía conformacional no local debida al empaquetamiento estérico en el estado plegado. La estabilidad marginal de las proteínas proviene precisamente de la pequeña diferencia entre grandes fuerzas que por una parte conducen al plegamiento con aquellas que se oponen al mismo. La hidrofobicidad lleva a conformaciones compactas con núcleos no polares en las proteínas globulares, pero en gran medida es el empaquetamiento estérico de las cadenas laterales el responsable de la arquitectura interna de estas macromoléculas. La razón para que solamente una estructura nativa esté codificada en la secuencia de aminoácidos puede ser en gran parte atribuible a la interacción hidrofóbica, pues hay solamente un número limitado de posibilidades de configurar una cadena polipeptídica para maximizar el número de contactos no polares en la macromolécula durante el plegamiento. Estas fuerzas son de una naturaleza tal que incluso las proteínas pueden ser tolerantes a la sustitución de ciertos aminoácidos en su secuencia, por lo que una estructura

nativa dada puede ser codificable por varias secuencias de aminoácidos ligeramente diferentes entre ellas, y por tanto una fracción significativa de todas las secuencias posibles debe producir el plegamiento correcto para condensar la cadena a estados nativos estructurados, estabilizados y que obviamente posean la función biológica para la cual han sido diseñados por la naturaleza.

#### LECTURAS RECOMENDADAS

1. Enrique García Hernández, Héctor Ceceña y Edgar Vázquez Contreras, *Érase una vez un proteinólogo... El faro. Boletín informativo de la Coordinación de la investigación científica*, Ciudad Universitaria, UNAM, noviembre 6, año III, núm. 32 p. 12 (2003).
2. Edgar Vázquez-Contreras, *La ciencia de las proteínas en el Siglo XXI, Materiales Avanzados*, vol. 1, núm 3, agosto, p. 13-18 (IIM, UNAM), ISSN: 1665-7051 (2004).
3. Martín González-Andrade, Daniel Adriano Silva Manzano, Israel Hernández Ruz, Edgar Vázquez Contreras y Alejandro Sosa Peinado, *La estructura y la visualización molecular de proteínas*, en *Mensaje Bioquímico*, vol XXIX (2005). O. Flores Herrera, H. Riveros Rosas, E. Rendón Huerta, A. Sosa Peinado, E. Vázquez Contreras e I. Velásquez López (editores), Depto Bioquímica, Facultad de Medicina de la UNAM, Ciudad Universitaria, México, D. F., ISSN: 0188-137X, pp. 157-180 (2005). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>).
4. María Elena Chánez Cárdenas y Edgar Vázquez Contreras. *El plegamiento de las proteínas*, en *La física biológica en México. Temas Selectos*. L. García Colín, L. Dagdug, A. Rojo y P. Mir-montes. El Colegio Nacional, ISBN: 970-640-317-5, pp. 195-215 (2006).
5. Edgar Vázquez-Contreras, *Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas*, en *Cincuenta años de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Memoria 1957-2007*, V. Calderón Salinas, F. Martínez Montes, D. González Halphen y J. Ramírez Salcedo (editores) pp. 332-334 (2007).
6. Edgar Vázquez Contreras, Priscilla Ibarra Rodríguez, Víctor Castillo-Sánchez y María Elena Chánez Cárdenas, *The unfolding*

*of proteins induced by different denaturants*, *Advances in protein physical chemistry*, E. García-Hernández y D. Alejandro Fernández-Velasco (editores), Transworld Research Network, India. pp. 169-192, ISBN: 978-81-7895-324-3 (2008).

#### REFERENCIAS

1. K. A. Dill, *Dominant forces in protein folding*, *Biochemistry* **29**, 7133-7155 (1990).
2. B. W. Matthews, *Genetic and structural analysis of the protein stability problem*, *Biochemistry* **26**, 6885-6888 (1987).
3. R. H. Haschemeyer y A. E. V. Haschemeyer, *Proteins, a guide to study by physical and chemical methods*, Wiley, Nueva York (1973).
4. H. Chick y C. J. Martin, *On the "heat coagulation" of proteins. Part II. The action of hot water upon egg-albumen and the influence of acid and salts upon reaction velocity*, *J. Physiol.* **43**, 1-27 (1911).
5. H. Wu y D. Y. Wu, *Nature of heat denaturation of proteins*, *J. Biol. Chem.* **64**, 369-378. (1925).
6. M. L. Anson y A. E. Mirsky, *On some general properties of proteins*, *J. Gen. Physiol.* **9**, 169-179 (1925).
7. T. B. Robertson, *The physical chemistry of the proteins*, Longmans, Green and Co., Nueva York. (1918).
8. H. Wu, *Studies on denaturation of proteins. XIII. A Theory of denaturation*, *Chinese Journal of Physiology* **5**, 321-344 (1931). Los reportes preliminares de estos estudios se presentaron en 1929 en el 13º Congreso Internacional de Fisiología, Boston, Mass., (agosto 19-24) y en un fascículo del *American Journal of Physiology*.
9. C. B. Anfinsen, *Principles that govern the folding of protein chains*, *Science* **181**, 223-230 (1973).
10. M. L. Anson y Mirsky A. E., *The reversibility of protein coagulation*, *J. Phys. Chem.* **35**, 185-193 (1931).
11. M. L. Anson, *Protein denaturation and the properties of protein groups*, *Adv. Protein. Chem.* **2**, 361-386 (1945).
12. H. Neurath, J. P. Greenstein, F. W. Putnam y J. A. Erickson, *The chemistry of protein denaturation*, *Chem. Rev.* **34**, 157-265 (1944).
13. R. Lumry y H. Eyring, *Conformational changes of proteins*, *J. Phys. Chem.* **58**, 110-120 (1954).

14. M. A. Eisenberg y G. W. Schwert, *The reversible heat denaturation of chymotrypsinogen*, *J. Gen. Physiol.* **34**, 583-606 (1951).
15. J. F. Brandts y R. Lumry, *The reversible thermal denaturation of chymotrypsinogen. Experimental characterization*, *J. Phys. Chem.* **67**, 1484-1494 (1963).
16. W. F. Harrington y J. A. Schellman, *Evidence for the instability of hydrogen-bonded peptide structures in water, based on studies of ribonuclease and oxidized ribonuclease*, *C R Trav. Lab. Carlsberg Chim.* **30**, 21-43 (1956).
17. P. L. Privalov, *Stability of proteins small globular proteins*, *Adv. Protein Chem.* **33**, 167-241 (1979).
18. P. L. Privalov, *Thermodynamic problems of protein structure*, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 47-69 (1989).
19. M. M. Santoro y D. W. Bolen, *Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants*, *Biochemistry* **27**, 8063-8068 (1988).
20. C. N. Pace, *The stability of globular proteins*, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **3**, 1-43 (1975).
21. P. L. Privalov, *Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system*, *Adv. Protein Chem.* **35**, 1-104 (1982).
22. E. Harber y C. B. Anfinsen, *Side-chain interactions governing the pairing of half-cysteine residues in ribonuclease*, *J. Biol. Chem.* **237**, 1839-1844 (1962).
23. K. Luger, U. Hommel, M. Herold, J. Hofsteenge, J. y K. Kirschner, *Correct folding of circularly permuted variants of a beta alpha barrel enzyme in vivo*, *Science* **13**, 206-210 (1989).
24. D. P. Goldenberg y T. E. Creighton, *Circular and circularly permuted forms of bovine pancreatic trypsin inhibitor*, *J. Mol. Biol.* **165**, 407-413 (1983).
25. J. E. Rothman, *Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells*, *Cell* **59**, 591-601 (1989).
26. T. L. Hill, *Introduction to statistical thermodynamics*, Addison-Wesley, Reading, MA. (1960).
27. K.U. Linderstrøm-Lang, *Proteins and enzymes*, Lane Medical Lectures, Stanford University Publications, University Series, Medical Sciences, vol. **6**, Stanford University Press (1952).
28. C. Tanford y J. G. Kirkwood, *Theory of protein titration curves. I. General equations for impenetrable spheres*, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5333-5339 (1957).
29. C. Tanford, *Theory of protein titration curves. II. Calculations for simple models at low ionic strength*, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5340-5347 (1957).
30. J. B. Matthew y F. R. N. Gurd, *Calculation of electrostatic interactions in proteins*, *Methods Enzymol.* **130**, 413-436 (1986).
31. J. B. Matthew y F. M. Richards, *Anion binding and pH-dependent electrostatic effects in ribonuclease*, *Biochemistry* **21**, 4989-4999 (1982).
32. M. K. Gilson y B. H. Honig, *Energetics of charge-charge interactions in proteins*, *Proteins* **3**, 32-52 (1988a).
33. M. K. Gilson y B. H. Honig, *Calculation of the total electrostatic energy of a macromolecular system: solvation energies, binding energies, and conformational analysis*, *Proteins* **4**, 7-18 (1988b).
34. D. Stigter y K. A. Dill, *Charge effects on folded and unfolded proteins*, *Biochemistry* **29**, 1262-1271 (1990).
35. D. Stigter, D. O. Alonso y Dill, *Protein stability: electrostatics and compact denatured states*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4176-4180 (1991).
36. C. Tanford, *Physical chemistry of macromolecules*, capítulo 7, Wiley, Nueva York (1961).
37. W. Kauzmann, *The mechanism of enzyme action* (McElroy, W. D. y Glass, B., Eds.) p 70, Johns Hopkins Press, Baltimore, MD (1954).
38. T. J. Morrison. *The salting-out of non-electrolytes. Part I. The effect of ionic size, ionic charge, and temperature*, *J. Chem. Soc.* **3**, 3814-3818 (1952a).
39. T. J. Morrison y F. Billett, *The salting-out of non-electrolytes. Part II. The effect of variation in non-electrolyte*, *J. Chem. Soc.* **3**, 3819-3822 (1952b).
40. K. R. Shoemaker, R. Fairman, D. A. Schultz, A. D. Robertson, E. J. York, J. M. Stewart y R. L. Baldwin, *Side-chain interactions in the C-peptide helix: Phe 8 ... His 12+*, *Biopolymers* **29**, 1-11 (1990).
41. E. J. Cohn, J. T. Edsall y M. H. Blanchard, *Studies in the physical chemistry of the proteins. XI. The amphoteric properties of zein*, *J. Biol. Chem.* **105**, 319-326 (1934).
42. A. E. Mirsky y L. Pauling, *On the structure of native, denatured, and coagulated proteins*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **22**, 439-447 (1936).
43. H. Eyring y A. E. Stearn, *The application of the theory of absolute reaction rates to proteins*, *Chem. Rev.* **24**, 253-270 (1939).
44. C. F. Jacobsen y K. Linderstrom-Lang, *Salt linkages in proteins*, *Nature* **164**, 411-412 (1949).

45. D. J. Barlow y J. M. Thornton, *Ion-pairs in proteins*, *J. Mol. Biol.* **168**, 867-85 (1983).
46. B. Honig y W. Hubbell, *Stability of "salt bridges" in membrane proteins*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 5412-5416 (1984).
47. B. Honig, W. Hubbell y R. F. Flewelling, *Electrostatic interactions in membranes and proteins*, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **15**, 163-193 (1986).
48. A. Wada y H. Nakamura, *Nature of the charge distribution in proteins*, *Nature* **293**, 757-758 (1981).
49. A. R. Fersht, *Conformational equilibria in alfa and beta chymotrypsin. The energetics and importance of the salt bridge*, *J. Mol. Biol.* **64**, 497-509 (1972).
50. M. F. Perutz y H. Raidt, *Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2*, *Nature* **255**, 256-259 (1975).
51. D. E. Anderson, W. J. Becktel, y F. W. Dahlquist, *pH-induced denaturation of proteins: a single salt bridge contributes 3-5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysozyme*, *Biochemistry* **29**, 2403-2408 (1990).
52. C. N. Pace y G. R. Grimsley, *Ribonuclease T1 is stabilized by cation and anion binding*, *Biochemistry* **27**, 3242-3246 (1988).
53. A. Zipp y W. Kauzmann, *Pressure denaturation of metmyoglobin*, *Biochemistry* **12**, 4217-4228 (1973).
54. J. F. Brandts, R. J. Oliveira y C. Westort, *Thermodynamics of protein denaturation. Effect of pressure on the denaturation of ribonuclease A*, *Biochemistry* **9**, 1038-1047 (1970).
55. H. Edelhoch y J. C. Osborne, *The thermodynamic basis of the stability of proteins, nucleic acids, and membranes*, *Adv. Protein Chem.* **30**, 183-250 (1976).
56. C. Tanford, *Protein denaturation*, *Adv. Protein Chem.* **23**, 121-282 (1968).
57. P. H. von Hippel y T. Schleich, *Structure and stability of biological macromolecules* (Timasheff, S., & Fasman, G., editores) Vol. **11**, p 417, Dekker, Nueva York (1969).
58. J. Hermans y H. A. Scheraga, *Structural studies of ribonuclease. V. Reversible change of configuration*, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3283-3292 (1961).
59. G. Acampora y J. Hermans, *Reversible denaturation of sperm whale myoglobin. I. Dependence on temperature, pH, and composition*, *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1543-1547 (1967).
60. M. Hollecker y T. E. Creighton, *Effect on protein stability of reversing the charge on amino groups*, *Biochim. Biophys. Acta* **701**, 395-404 (1982).
61. S. H. Friend y F. R. N. Gurd, *Electrostatic stabilization in myoglobin. pH dependence of summed electrostatic contributions*, *Biochemistry* **18**, 4612-4619 (1979).
62. Y. Goto y A. L. Fink, *Conformational states of beta-lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt*, *Biochemistry* **28**, 945-952 (1989).
63. N. A. Campbell, B. Williamson y R. J. Heyden, *Biology: Exploring Life*, Boston, Massachusetts: Pearson Prentice Hall (2006).
64. J. Emsley, *Very strong hydrogen bonds*, *Chem. Soc. Rev.* **9**, 91-124 (1980).
65. O. Markovitch y N. Agmon, *Structure and energetics of the hydronium hydration shells*, *J. Phys. Chem. A* **111**, 2253-2256 (2007).
66. A. C. Legon y D. J. Millen, *Angular geometries and other properties of hydrogen-bonded dimers: a simple electrostatic interpretation of the success of the electron-pair model*, *Chem. Soc. Rev.* **16**, 467-498 (1987).
67. T. S. Moore y T. F. Winmill, *The state of amines in aqueous solution*, *J. Chem. Soc.* **101**, 1635-1676 (1912).
68. W. M. Latimer y W. H. Rodebush, *Polarity and ionization from the standpoint of the Lewis theory of valence*, *J. Am. Chem. Soc.* **42**, 1419-1433 (1920).
69. W. L. Jorgensen y J. D. Madura, *Temperature and size dependence for Monte Carlo simulations of TIP4P water*, *Mol. Phys.* **56**, 1381-1392 (1985).
70. J. Zielkiewicz, *Structural properties of water: comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water*, *J. Chem. Phys.* **123**, 104501 (2005).
71. D. Chandler, *Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly*, *Nature* **437**, 640-647 (2005).
72. G. Hartley, *Aqueous solutions of paraffin-chain salts*, Hermann y Cie., Paris, como lo cita Tanford, C. (1973) *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, p. viii, John Wiley & Sons, Nueva York (1936).
73. C. Horváth, W. Melander y I. Molnár, *Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases*, *J. Chrom.* **125**, 129-156 (1976).
74. C. Pace, B. Shirley, M. McNutt, K. Gajiwala, *Forces contributing to the conformational stability of proteins*, *FASEB J.* **10**, 75-83 (1996).



75. G. Rose, P. Fleming, J. Banavar y A. Maritan, *A backbone-based theory of protein folding*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16623-16633 (2006).
76. C. Pace, *Evaluating the contribution of hydrogen bonding and hydrophobic bonding to protein folding*, *Methods Enzymol.* **259**, 538-554 (1995).
77. A. J. Doig y M. J. E. Sternberg, *Side-chain conformational entropy in protein folding*, *Protein Science* **4**, 2247-2251 (1995).
78. J. Zhang y J. S. Liu, *On side-chain conformational entropy of proteins*, *PLoS Comput. Biol.* **2**(12) e168 (2006).
79. S. D. Pickett y M. J. Sternberg, *Empirical scale of side-chain conformational entropy in protein folding*, *J. Mol. Biol.* **231**, 825-839 (1993).
80. K. Watanabe, T. Masuda, H. Ohashi, H. Mihara e Y. Suzuki, *Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize bacillus cereus ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule*, *Eur. J. Biochem.* **226**, 277-283 (1994).

## CAPÍTULO 8 ESTUDIO DE LAS RUTAS DE (DES)PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS USANDO LA COMPUTADORA COMO MICROSCOPIO MOLECULAR

NINA PASTOR COLÓN\*

D. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO\*\*

\*Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

\*\*Facultad de Medicina, UNAM

### 1. EL ESPACIO CONFORMACIONAL DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son cadenas lineales de aminoácidos. En ellas, los aminoácidos se unen mediante enlaces sencillos que pueden rotar, por lo que la cadena puede adoptar un gran número de conformaciones. El colectivo formado por todas estas conformaciones está determinado por el espacio o paisaje conformacional. Éste es la superficie de energía libre que relaciona la conformación de la proteína (definida en función de los ángulos de rotación  $\phi$  y  $\psi$ , y de la hidratación de la cadena) con la energía libre de cada conformación [1]. Dentro del espacio conformacional es posible distinguir macroestados, esto es, grupos de conformaciones que comparten características energéticas. Entre ellos resalta el estado biológicamente activo o "nativo", formado por un número reducido de conformeros, estructuralmente muy semejantes y usualmente compactos. En el resto del espacio conformacional, se

\* nina@uaem.mx \*\* fdaniel@servidor.unam.mx

encuentran los estados "no nativos", entre los cuales destaca el estado desnaturalizado, formado por colectivos de conformaciones aleatorias en constante interconversión. Durante o después de su biosíntesis, las proteínas transitan del estado desnaturalizado al estado nativo. A esta transición conformacional se le llama "plegamiento de proteínas". El plegamiento es un paso central en la transformación de la información genética unidimensional en la información tridimensional funcional. A continuación revisaremos cómo a partir de experimentos *in vitro* e *in silico*, es posible estudiar esta transición conformacional.

### 1.1. Anfinsen y la hipótesis termodinámica: El estado nativo es el de menor energía

La población relativa de las proteínas en diferentes estados conformacionales se modifica drásticamente con las condiciones ambientales, de manera que en extremos de temperatura, presión y pH, o en presencia de concentraciones elevadas de solutos como la urea y el cloruro de guanidinio, las proteínas se despliegan. Anfinsen mostró que *in vitro* las proteínas se pliegan espontáneamente hacia el estado nativo cuando las condiciones ambientales retornan a valores fisiológicos, esto es, al regresar a temperatura y presión ambiente o al remover los agentes desnaturalizantes. Este hecho da lugar a la hipótesis termodinámica, de acuerdo a la cual en condiciones fisiológicas el estado nativo es el estado de mínima energía libre [2].

Entre las interacciones favorables en el estado nativo están los puentes de hidrógeno, las interacciones entre grupos con carga opuesta y el efecto hidrofóbico resultante de la desolvatación de grupos no polares. Todas estas interacciones contrarrestan la gran disminución en

entropía que acompaña al plegamiento, y son fuertemente dependientes de la secuencia de aminoácidos en la cadena; por lo tanto, no cualquier secuencia es plegable, como muestran las proteínas intrínsecamente desordenadas [3]. La diferencia de energía entre el estado nativo y el desnaturalizado ( $\Delta G$ ) es marginal (5-20 kcal mol<sup>-1</sup>) [4]; esto no es un accidente o un error de diseño, sino parece ser importante para la función *in vivo* de las proteínas.

### 1.2. Levinthal y las restricciones cinéticas: Vías de plegamiento y embudos de energía

¿Qué tan vasto es el paisaje conformacional? Hace cuarenta años Levinthal mostró que el espacio conformacional es tan amplio, que el tiempo requerido para visitar todas las conformaciones posibles es astronómicamente inmenso [5]. Ya que las proteínas adquieren la conformación nativa en segundos o minutos, es claro que no pueden visitar todo el espacio conformacional hasta alcanzar el estado de mínima energía. Por ello se propone que existen "rutas de plegamiento" formadas por aquellas regiones del paisaje conformacional que son visitadas preferentemente por la cadena en su tránsito entre el estado desnaturalizado y el nativo. Además, el estado nativo debe ser notablemente más estable que cualquier otra conformación, para evitar efectos de frustración en la cadena, es decir, que pueda adquirir más de una conformación con la misma energía.

La transformación entre el estado nativo y el desnaturalizado generalmente presenta al menos un estado de transición, definido como la conformación de más alta energía y por lo tanto de muy corta vida, en la ruta que

conecta a ambos estados estables. Dada la naturaleza multidimensional del paisaje conformacional, en realidad el estado de transición está compuesto por un ensamble de conformaciones que ya presentan algunas de las interacciones propias del estado plegado y por lo tanto predisponen al polímero a la topología nativa [6]. La velocidad con la que las proteínas se pliegan y despliegan depende de la altura de la barrera de activación, esto es, la diferencia en energía entre los estados estables y el estado de transición ( $\Delta G^\ddagger$ ) (figura 1). Cuando no se detectan conformaciones intermedias entre el estado nativo y el desnaturalizado, se dice que la transición es de dos estados. Sin embargo, en ciertas condiciones es posible encontrar intermediarios estables, esto es, conformaciones que presentan alguna característica estructural que las diferencia del

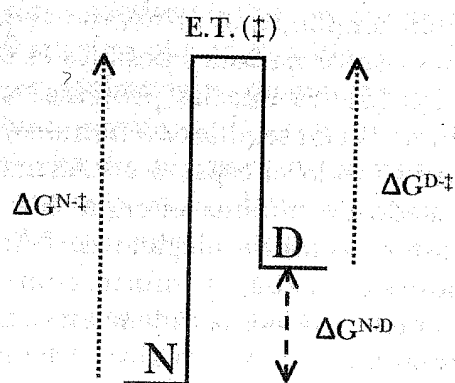


Figura 1. Perfil de energía libre para una reacción de dos estados. "N" representa al estado nativo, "E.T." al estado de transición y "D" al estado desnaturalizado. Con una línea discontinua se muestra la diferencia en energía libre entre el estado nativo y el desnaturalizado ( $\Delta G^{N-D}$ ), con líneas punteadas se muestran las energías de activación para el desplegamiento ( $\Delta G^{N-\ddagger}$ ) y replegamiento ( $\Delta G^{D-\ddagger}$ ) de la proteína. Los valores al equilibrio se relacionan con los cinéticos mediante  $\Delta G^{N-D} = \Delta G^{N-\ddagger} - \Delta G^{D-\ddagger}$ .

estado desnaturalizado, pero que aun no adquieren todas las propiedades estructurales del estado nativo.

La caracterización del ensamble del estado de transición y de los intermediarios estables ha sido constantemente perseguida ya que se cree que estas conformaciones contienen la información estructural que guía la formación del estado nativo. Por cada nueva especie estable, es posible definir un nuevo estado de transición (figura 2).

El número de conformaciones posibles en el estado desnaturalizado es inmenso y decrece a medida que la reacción de plegamiento avanza; del mismo modo, las conformaciones iniciales son de alta energía y a medida que la proteína se pliega, las conformaciones que se observan presentan menor energía libre. Por ello, el

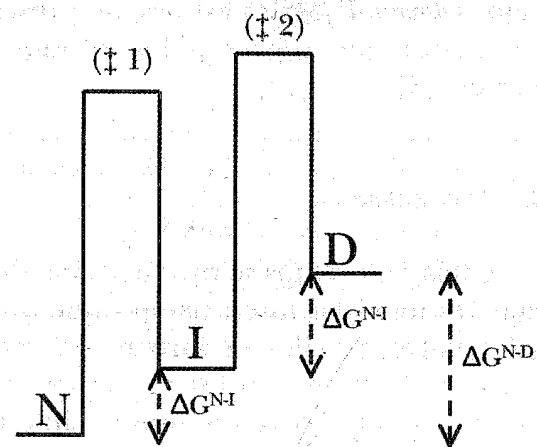


Figura 2. Perfil de energía libre para una reacción de tres estados. "N" representa al estado nativo, "‡1" y "‡2" a los estados de transición 1 y 2, respectivamente y "D" al estado desnaturalizado. Con líneas discontinuas se muestran las diferencias en energía libre entre el estado nativo y el intermediario ( $\Delta G^{N-I}$ ) y entre el estado intermediario y el estado desnaturalizado ( $\Delta G^{I-D}$ ). Se muestra el cambio total en energía entre el estado nativo y el desnaturalizado ( $\Delta G^{N-D} = \Delta G^{N-I} + \Delta G^{I-D}$ ).

paisaje conformacional de las proteínas se representa como un embudo energético, en el cual se esquematizan la disminución en el número de conformaciones y en la energía de las proteínas a medida que éstas se pliegan. Esta analogía hace evidente la posibilidad de múltiples rutas de plegamiento (figura 3). Cada contacto formado entre átomos de la proteína hace que disminuya la energía y que se compacte la cadena; si sólo se forman contactos presentes en la estructura nativa, cada nuevo contacto acerca a la proteína al fondo del embudo. Sin embargo, la formación de contactos no nativos genera intermediarios. Mientras menos rugoso sea el paisaje, menos intermediarios existirán en la ruta, y por lo tanto el plegamiento será más rápido. Por otra parte, se ha propuesto que algunas proteínas pequeñas se pliegan "cuesta abajo" (*downhill folders*) esto es, no presentan una barrera energética que separe a los estados nativo y desnaturalizado [8].

### 1.3. Modelos de plegamiento

¿Qué secuencia de eventos se produce cuando la cadena se pliega? De todas las interacciones que observamos en el estado nativo, ¿cuáles se forman en etapas tempranas y cuáles al final del proceso? La evidencia experimental obtenida a lo largo de los años se sintetiza en los siguientes modelos de plegamiento: el modelo de armazón y variantes posteriores como el modelo de difusión/colisión, proponen que las interacciones locales, como los puentes de hidrógeno que definen las hélices  $\alpha$ , se forman inicialmente; posteriormente estos elementos de estructura secundaria se asocian formando estructuras supersecundarias y, finalmente, dominios de plegamiento.

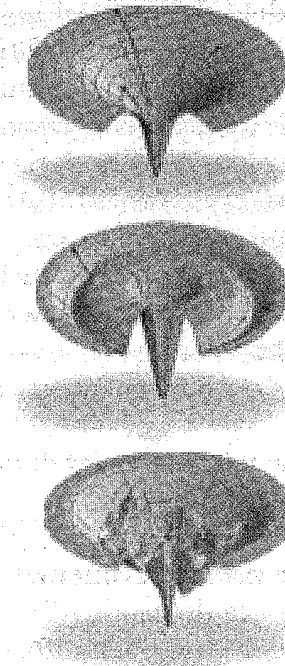


Figura 3. Embudos energéticos y espacio conformacional de las proteínas. El estado desnaturalizado comprende las conformaciones localizadas en la parte superior del embudo, mientras que el estado nativo se encuentra en el fondo de éste. El panel superior muestra el embudo resultante para una proteína que se pliega sin barreras de activación. En el panel central se muestra el plegamiento que requiere de la formación de un intermediario. El panel inferior muestra el paisaje "rugoso" de una proteína que muestra múltiples vías y múltiples intermediarios. Los esquemas mostrados en las figuras 1 y 2 corresponden a cortes bidimensionales sobre los embudos en esta figura, modificada de la referencia [1].

En el modelo del colapso hidrofóbico la proteína adopta inicialmente conformaciones compactas, en las cuales se forma un núcleo hidrofóbico. La cercanía espacial de los grupos facilita la búsqueda conformacional requerida para formar las interacciones locales que llevan al estado nativo. Por último, entre estos dos casos extremos

se encuentra el modelo de nucleación/condensación, el cual propone que las estructuras secundaria y terciaria se forman en paralelo; el estado de transición muestra la estructura del estado nativo distorsionada, en donde los elementos de la estructura secundaria son estabilizados por las interacciones terciarias [9]. Para determinar cuál es el comportamiento observado en una proteína particular, es necesario determinar la evolución temporal y los valores al equilibrio de diversas señales espectroscópicas sensibles a la estructura.

#### 1.4. Caracterización *in vitro* de estados de transición e intermediarios de plegamiento

Desde el punto de vista experimental la caracterización del plegamiento implica determinar las barreras cinéticas y termodinámicas del espacio conformacional visitado por la proteína en su travesía del estado desnaturalizado al nativo y viceversa [4,6,9]. Esto requiere de metodologías sensibles a los cambios conformacionales, capaces de determinar la proporción de moléculas en diferentes estados. Tal es el caso del dicroísmo circular sensible a la quiralidad estructural del enlace peptídico y de los aminoácidos aromáticos y, por lo tanto, al cambio en las estructuras secundaria y terciaria; la fluorescencia, sensible a la solvatación de los triptofanos; y la resonancia magnética nuclear, sensible al ambiente magnético y electrónico de los núcleos atómicos, a partir de la cual es posible determinar las distancias relativas entre un gran número de átomos de la cadena, los ángulos de enlace entre grupos de tres y cuatro átomos covalentemente conectados, y el intercambio químico de protones entre la proteína y el solvente.

#### 1.4.1. Termodinámica, diferencias en energía

En el caso más sencillo, esto es, para una proteína que presenta un patrón de dos estados, se acostumbra aumentar la temperatura o la concentración de un agente desnaturante y determinar la concentración relativa de los estados nativo y desnaturado en función de la perturbación. Cuando las señales obtenidas no varían con el tiempo y las transiciones observadas son reversibles (es decir, es posible pasar del estado nativo al desnaturado o del desnaturado al nativo), es posible obtener la constante de equilibrio

$$K_{eq} = [\text{Nativo}] / [\text{Desnaturado}] \quad (1)$$

A partir de la  $K_{eq}$  se determina la diferencia de energía entre los estados ( $\Delta G_{D-N} = -RT \ln K_{eq}$ ; donde R es la constante de los gases ideales y T la temperatura absoluta). Cuando la transición no es de dos estados, esto es, cuando la señal espectroscópica detecta la acumulación de un estado intermediario, es posible determinar el  $\Delta G$  entre el estado desnaturado y el nativo ( $\Delta G_{D-I}$ ) y el  $\Delta G$  entre el intermediario y el estado plegado ( $\Delta G_{I-N}$ ).

#### 1.4.2. Cinética y energías de activación

En la caracterización cinética se determina la evolución temporal del sistema entre diferentes estados conformacionales. En los experimentos de desnaturación se monitorean los cambios conformacionales que tienen lugar cuando la proteína nativa es transferida a condiciones desnaturantes; en experimentos de renaturalización,

la proteína previamente desnaturalizada es transferida a condiciones benignas. Los cambios observados como función del tiempo son generalmente ajustados mediante ecuaciones que contienen uno o más términos exponenciales. En el caso más sencillo, esto es, para una transición reversible entre dos estados, las constantes de velocidad de plegamiento o desplegamiento ( $k_{\text{pleg}}$  y  $k_{\text{Desp}}$ , respectivamente) obtenidas en presencia de urea o cloruro de guanidinio, son utilizadas para obtener el valor de estas constantes en presencia de desnaturalizante. La barrera de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ) es obtenida mediante la ecuación de Eyring

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln (kh/k_B T) \quad (2)$$

donde  $k$  es la constante de velocidad,  $h$  la constante de Planck,  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura. Las barreras energéticas que separan a los estados nativo y desnaturalizado del estado de transición,  $\Delta G_{D \rightarrow \ddagger}$  y  $\Delta G_{N \rightarrow \ddagger}$ , respectivamente, son obtenidas a partir de  $k_{\text{pleg}}$  y  $k_{\text{Desp}}$ .

### 1.4.3. Caracterización experimental del estado de transición

A partir de los experimentos señalados es posible determinar el perfil de energía para el plegamiento de la proteína (ver figura 1). Esta representación bidimensional macroscópica del plegamiento permite conocer las diferencias de energía entre los estados estables y el estado de transición. Al analizar la estructura tridimensional de las proteínas es posible postular interacciones que estabilizan entálpicamente al estado nativo. Imaginemos: en el interior de la proteína encontramos un aminoácido

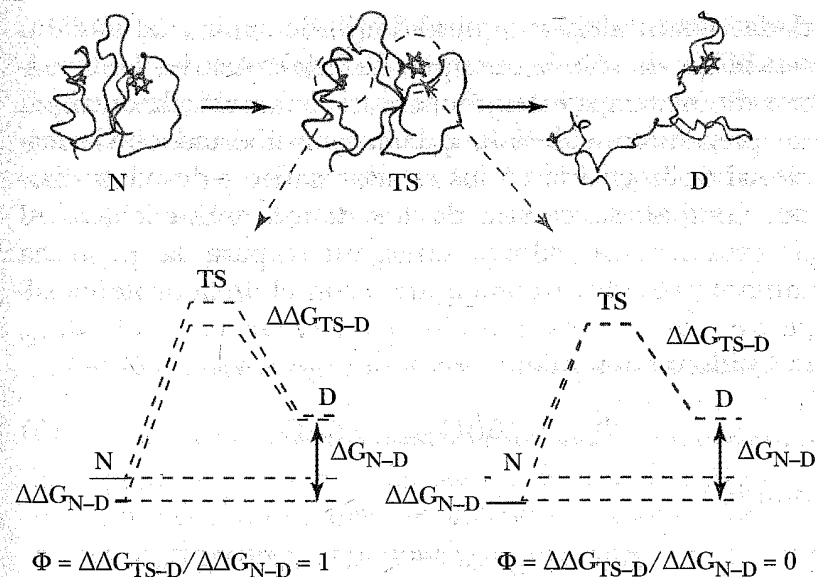


Figura 4. Perfiles de energía libre y valores  $\phi$ . Las líneas discontinuas azules corresponden a la proteína nativa, las rojas a proteínas mutantes. El diagrama de la izquierda muestra cómo al remover mediante mutagénesis una interacción (aminoácido en verde en la figura superior) que se encuentra formada en el estado de transición (TS), el efecto de la mutación sobre los parámetros de equilibrio ( $\Delta\Delta G^{D-N}$ ) es semejante al efecto sobre los parámetros de activación ( $\Delta\Delta G^{S-D}$ ), y por lo tanto  $\phi = 1$ . El diagrama de la izquierda muestra el efecto esperado al remover mediante mutagénesis una interacción que aún no ha sido formada en el TS (aminoácido en azul en la figura superior). En este caso  $\Delta\Delta G^{S-D} = 0$  y por lo tanto  $\phi = 0$ . Tomado de la referencia 9.

hidrofóbico (una valina por ejemplo) y deseamos conocer si su cadena lateral también se encuentra oculta del solvente en el estado de transición. Mediante mutagénesis dirigida es posible cambiar a la valina por un aminoácido más pequeño (por ejemplo, una alanina). Podría ser también una glicina, pero esto complica el análisis

dada la naturaleza no quiral de la glicina, la cual pudiera modificar no sólo la entalpía, fácil de entender en términos de contactos interatómicos, sino también la entropía de plegamiento debido a la mayor libertad conformacional de la glicina en los estados nativo y desnaturalizado, comparada con la de los demás aminoácidos. Al determinar los valores energéticos para la proteína mutante ( $\Delta G^{\text{Mut}}$ ) y compararlos con el de la proteína silvestre ( $\Delta G^{\text{Silv}}$ ), es posible determinar el valor  $\Phi_{\text{Pleg}}$ , definido de la siguiente manera (figura 4):

$$\Phi_{\text{Pleg}} = (\Delta\Delta G_{\text{TS-D}} / \Delta\Delta G_{\text{D-N}}) \quad (3)$$

donde

$$\Delta\Delta G_{\text{TS-D}} = \Delta G_{\text{TS-D}}^{\text{Silv}} - \Delta G_{\text{TS-D}}^{\text{Mut}}$$

y

$$\Delta\Delta G_{\text{D-N}} = \Delta G_{\text{D-N}}^{\text{Silv}} - \Delta G_{\text{D-N}}^{\text{Mut}} \quad (4)$$

Si la interacción removida no se encuentra presente en el estado de transición, no observaremos diferencias entre la velocidad de plegamiento de la proteína silvestre y la de la mutante, esto es,  $\Delta G_{\text{TS-D}}^{\text{Silv}} = \Delta G_{\text{TS-D}}^{\text{Mut}}$ .  $\Delta\Delta G_{\text{TS-D}}$  es cero, y por lo tanto,  $\Phi_{\text{Pleg}} = (0 / \Delta\Delta G_{\text{D-N}}) = 0$ . Si por el contrario, la interacción removida se encuentra presente en el estado de transición de la proteína silvestre, observaremos que la desestabilización de la constante de equilibrio inducida por la mutación  $\Delta\Delta G_{\text{D-N}}$  es de la misma magnitud que la desestabilización provocada en la barrera de activación  $\Delta\Delta G_{\text{TS-D}}$  y por lo tanto,  $\Phi_{\text{Pleg}} = 1$ . Estos valores extremos de  $\Phi$  son fáciles de interpretar; sin embargo, frecuentemente se observan valores intermedios de  $\Phi$ , los cuales pueden implicar la formación parcial de la interacción o la presencia de vías múlti-

ples de plegamiento. También es posible encontrar valores de  $\Phi$  menores que 0 y mayores que 1 [6]. Mediante la determinación de los valores  $\Phi$  para un gran número de interacciones en la proteína es posible determinar la estructura del estado de transición [4,6,9,10]. Cuando se observan intermediarios, los métodos descritos de ingeniería de proteínas permiten evaluar la estructura de estos estados.

#### 1.4.4. Resonancia magnética nuclear y la protección de amidas

En solución, el hidrógeno unido a las amidas del enlace peptídico puede intercambiarse con los protones de las moléculas del solvente. Este intercambio se ve severamente disminuido cuando la amida forma un puente de hidrógeno con otro elemento de la proteína. Como el hidrógeno sí da señal en experimentos de resonancia magnética nuclear pero el deuterio no, el intercambio de isótopos del hidrógeno detectado mediante resonancia magnética nuclear es una poderosa estrategia para determinar la formación de estructura secundaria. En un experimento típico, la proteína se desnatura en agua deuterada, de manera que todos los hidrógenos intercambiables de la proteína sean deuterios y no se detecte señal proveniente de ninguno. El intercambio de deuterios por protones, observado al cambiar el solvente en el que se encuentra la proteína a agua ligera sin desnaturante, se cuantifica mediante el factor de protección, el cual relaciona el intercambio observado con el esperado para un grupo expuesto. Los factores de protección experimentales pueden ser utilizados como restricciones o para validar simulaciones de dinámica molecular (*vide infra*) [11, 12]. El análisis de los experimentos descritos requiere de modelos moleculares del plegamiento.

Las simulaciones por dinámica molecular o por Monte Carlo de procesos de plegamiento permiten explorar hipótesis sobre el mecanismo utilizado por proteínas pequeñas para alcanzar el estado nativo. Estas herramientas computacionales son el puente entre las teorías sobre el plegamiento y los experimentos.

## 2. DINÁMICA MOLECULAR DEL (DES)PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS

La mecánica estadística establece una conexión entre el mundo microscópico y la termodinámica. Las propiedades que comúnmente se miden en el laboratorio corresponden al comportamiento promedio de una colección muy grande de partículas, promediado a su vez sobre el tiempo que dura el proceso de medición. Para cada uno de los macroestados medibles, existe una colección de microestados que contribuyen a la distribución cuyo promedio es medido. El papel de las simulaciones por dinámica molecular es generar esta colección de microestados, ordenados en el tiempo. Otras técnicas de simulación como el Monte Carlo también generan una colección de microestados, pero éstos no están relacionados entre sí por una flecha temporal.

Las simulaciones por dinámica molecular parten de una estructura inicial, determinada por las coordenadas espaciales de cada una de las partículas del sistema, una asignación inicial de velocidades para cada partícula, y una función de energía potencial que detalla de forma analítica todas las interacciones relevantes para el sistema. Con las coordenadas y velocidades iniciales, y las fuerzas de interacción obtenidas del gradiente del potencial, se modifican coordenadas y velocidades de cada partícula

paso a paso, en intervalos de fs, usando la segunda Ley de Newton. La dinámica molecular fue propuesta para el ensamble microcanónico (NVE), en el que se mantienen fijos el número de partículas, el volumen y la energía total del sistema. Sin embargo, actualmente es posible hacer simulaciones en muchos otros ensambles para facilitar la comparación con condiciones experimentales, previa modificación de las ecuaciones de movimiento. Los más comunes son el ensamble canónico (NVT, que fija número de partículas, volumen y temperatura) y en el isobárico-isotérmico (NPT). Las simulaciones se pueden hacer con diferentes resoluciones espaciales, temporales y energéticas. La resolución depende del problema de estudio y de los recursos de cómputo disponibles; en general, una mayor resolución espacial implica también mayor resolución temporal y energética. Recomendamos la revisión reciente del grupo de Wilfred van Gunsteren para una discusión a profundidad de las metas, problemas y perspectivas del modelado molecular [13].

La motivación central para hacer simulaciones con dinámica molecular del proceso de plegamiento de proteínas es que nos encantaría poder verlo. Desafortunadamente el tamaño de las proteínas hace que no sea factible observarlas en el proceso de plegarse usando un microscopio óptico. Las simulaciones por dinámica molecular son lo más cercano a un microscopio molecular. Además, las simulaciones permiten explorar el papel de distintas contribuciones al proceso de plegado, variando propiedades que no son trivialmente modificables en un entorno experimental. Por ejemplo, permiten jugar con los pesos que se dan a interacciones específicas, o con la polaridad del medio o del desnaturalizante. Las simulaciones tienen un papel importante en la explicación de lo que se mide; toda medida experimental requiere un modelo molecular



para ser interpretada. Asimismo, las simulaciones son esenciales en la exploración de las consecuencias de las premisas en las que se basan las teorías de plegamiento. A continuación describimos los modelos y técnicas de simulación de uso común en el estudio del plegamiento de proteínas.

## 2.1. Distintos modelos para la cadena

### 2.1.1. Modelos con detalle atómico

Las simulaciones por dinámica molecular clásica con una representación de todos los átomos del sistema suponen básicamente que cada átomo es una esfera blanda con carga. Los enlaces se modelan como potenciales armónicos, así como los ángulos de enlace y algunas restricciones sobre la planaridad o piramidalidad de ciertos grupos químicos, como el grupo guanidino de las argininas que debe mantenerse aproximadamente plano. La rotación sobre enlaces, propiedad crucial para entender el plegamiento de proteínas, está representada como una serie de cosenos que toma en cuenta la estereoquímica de los átomos unidos al enlace sobre el que se gira. Las interacciones no covalentes están representadas con un término de Lennard-Jones, que da cuenta de la repulsión electrónica al contacto entre átomos y de la interacción atractiva dispersiva entre nubes electrónicas contiguas. La interacción electrostática se supone aditiva en general, y está descrita con un potencial coulombiano entre cargas puntuales. Las formas funcionales que describen estas interacciones se conocen como campos de fuerza (*force-fields*) y se eligen de manera que sean analíticamente diferenciables y computacionalmente accesible su eva-

luación (en general no se usan exponenciales y se usan potencias pares de las distancias, para evitar las raíces cuadradas). Los campos de fuerza más utilizados son ENCAD, CHARMM, AMBER y GROMACS y sus parámetros están ajustados a una gran cantidad de datos experimentales y a cálculos *ab initio* de estructuras de moléculas pequeñas [13]. A partir de estas funciones se obtienen las fuerzas de interacción entre las partículas del sistema, las cuales modifican la cantidad y dirección de movimiento de las partículas, generando una sucesión de colecciones de coordenadas en función del tiempo (algo similar a una película conformada por una sucesión ordenada de fotos).

Los campos de fuerza están validados contra datos experimentales y además están en constante refinamiento. Para el modelado del plegamiento de proteínas ENCAD es notable el poder predecir la temperatura media ( $T_m$ ) de desnaturalización de las proteínas, mientras que los otros campos de fuerza los sobreestiman por cien grados aproximadamente, probablemente por haber sido parametrizados para reproducir propiedades del estado nativo, al cual estabilizan exageradamente.

### 2.1.2. Modelos reducidos

Por supuesto, mientras más detalle tenga el modelo que se elige, más partículas tendrá, más veces habrán de ser evaluadas las funciones de energía potencial y más tardadas serán las simulaciones. No sólo eso, sino que mientras más grados de libertad sean tomados en cuenta, más rugoso será el paisaje conformacional y habrá más oportunidades para que la proteína se quede atorada en mínimos locales lejanos al estado nativo. Reconociendo

que tener mucho detalle puede ser inconveniente no sólo por hacer lentas las simulaciones sino por tener más grados de libertad de los esenciales para entender el proceso [14], se ha propuesto una gran variedad de modelos reducidos para las proteínas. Un extremo interesante son los modelos de cuentas, en los que se construye una proteína como una cadena de cuentas de dos tipos: H y P. Las H son hidrofóbicas y se asigna una ventaja energética al tener dos o más de éstas en contacto, mientras que juntar H con P o P con P no da ni ventajas ni penalizaciones. La simulación se puede hacer en una malla (con diversas geometrías; la más común es cuadrada) o en espacio libre. Esto es un modelo de Go [15] y presenta varias ventajas. Como sólo se favorecen los contactos presentes en la estructura nativa (recordemos que típicamente el interior es hidrofóbico) este potencial genera un paisaje conformacional mínimamente frustrado, con un mínimo claramente diferenciado del resto de las estructuras posibles y prácticamente sin barreras, como el mostrado en el panel superior de la figura 3. La economía computacional de este modelo ha permitido explorar todo el espacio de secuencias HP para cadenas de 27 monómeros, dando como resultado por ejemplo, que no toda secuencia es plegable. Esto se anticipaba del estudio de secuencias de aminoácidos de proteínas naturales, pero es interesante el entender qué hace a una secuencia plegable y a otra no. Un principio general que emerge de estos estudios es que tiene que haber un número suficiente de residuos H para formar un corazón hidrofóbico, pero también tienen que haber suficientes P para cubrir la superficie; de otra manera, o no hay con qué armar el corazón, o hay muchas maneras de armarlo, dando como resultado un polímero frustrado, como las proteínas intrínsecamente desordenadas.

Al modelo HP se le ha extendido para considerar más tipos de interacciones, culminando en potenciales de contacto tipo Miyazawa-Jernigan [15]. Estos potenciales de contacto se obtienen de análisis de estructuras de proteínas en el estado nativo, depositadas en el PDB. Se construyen histogramas de la frecuencia de aparición de una pareja de aminoácidos en función de la distancia, y después estos histogramas se traducen a funciones de energía libre de contacto. La gran mayoría de estos potenciales son aditivos por pares, pero recientemente se han incluido efectos no aditivos; por ejemplo, es más ventajoso tener tres cuentas H juntas, que dos pares de parejas [6]. Este tipo de refinamiento tiene por objeto incluir de forma efectiva el diferente costo entrópico que implica formar un primer contacto o crecer una zona ya ordenada.

### 2.1.3. El papel del solvente

La gran mayoría de las simulaciones con modelos reducidos se hacen sin considerar al solvente, aunque ya se están trabajando variantes que lo incluyen de forma implícita asignando energías diferentes a grupos H o P cuando están expuestos en la superficie o enterrados en el corazón. El modelado del solvente puede hacerse de esta forma, considerándolo como un medio dieléctrico con o sin fricción, o con todo detalle atómico. Cada nivel de descripción tiene sus ventajas y desventajas. Las proteínas en el tubo de ensayo se pliegan en presencia de moléculas de agua y un detalle mecanístico en discusión en la actualidad es en qué momento se vuelve prácticamente anhidro el corazón de la proteína. Para poder contestar esta pregunta es indispensable modelar explícitamente cada molécula de agua. Sin embargo, para identi-

ficar rutas de plegamiento parece no ser necesario tanto detalle y con el modelo de continuo dieléctrico es suficiente. Esto no tiene por qué ser un fenómeno general, por lo que se recomienda, si se tiene el poder de cómputo necesario, simular con solvente explícito [16].

## 2.2. Estrategias de muestreo para procesos fuera del equilibrio

Cuando uno simula una condición de equilibrio, por ejemplo las fluctuaciones alrededor del estado nativo de una proteína, lo que tiene sentido físico es el promedio de una propiedad calculada a lo largo del tiempo. Como se está simulando una condición de equilibrio, es posible que se crea que lo que ocurre durante unos cuantos ns es lo mismo que ocurre durante minutos u horas. Recuérdese que lo que hace la dinámica molecular es generar una colección de microestados, los cuales contribuyen al macroestado que es medido en el laboratorio. Otra opción es hacer un promedio sobre muchas simulaciones; a esto se le llama un promedio de ensamble y se puede pensar como el efecto de medir una propiedad en múltiples copias de un sistema, en lugar de promediar sobre un sistema a lo largo del tiempo. La técnica de simulación por Monte Carlo genera este tipo de ensambles. Por supuesto, ambos tipos de promedio se pueden combinar, como veremos más adelante.

La diferencia central entre la simulación de un proceso y las simulaciones de estados de equilibrio, en las cuales con verlas un momento es suficiente, es que el proceso tiene que ocurrir durante la simulación para poder darla por concluida; de preferencia, debería ocurrir varias veces durante la simulación.

Si uno quiere simular un proceso, en general se necesitan simular muchas copias del mismo, partiendo de

condiciones iniciales diferentes. Por ejemplo, para simular la asociación entre dos moléculas lo que se hace es dejar una de ellas fija y simular un orden de 10 000 trayectorias de asociación iniciadas desde lugares diferentes alrededor de la molécula fija. La tasa de asociación se calcula con el cociente de trayectorias exitosas (las que encontraron a la molécula fija) sobre el total de intentos. Esto pretende simular el proceso de colisión azarosa que se da en un tubo de ensaye o la célula. En el caso particular del plegamiento, dado que el ensamble de conformaciones que corresponde al estado desnaturalizado es muy heterogéneo, es fácil imaginar que al menos al principio del proceso habrán muchas rutas posibles para iniciar el plegamiento; si uno tiene la mala suerte de comenzar la simulación a partir de una conformación proclive a tomar una ruta larga de plegamiento, esa simulación estará condenada al fracaso, en el sentido de que no encontrará el estado nativo en el tiempo accesible de cómputo. Por otro lado, estas simulaciones proporcionan información valiosa sobre estados tempranos de plegamiento y formación de intermediarios. Muestra de esto son las simulaciones de Duan y Kollman del plegamiento de la vilina [17] (de 36 aminoácidos) con duración de 1  $\mu$ s y las más recientes del grupo de Schulten de una variante particularmente rápida para plegarse de un dominio WW [18] (de 35 aminoácidos) de 10  $\mu$ s de duración. A pesar de haber aumentado un orden de magnitud el tiempo total de simulación, ninguna de las simulaciones resultó en la adquisición del estado nativo. Un trabajo reciente muestra que esta limitación es práctica, derivada de las capacidades de cómputo actuales y no fundamental [19]: Honda y colaboradores reportan la caracterización estructural por cristalografía, resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular y dinámica molecular de una

miniproteína de diez aminoácidos llamada CLN025. Con simulaciones de 1  $\mu$ s de duración lograron el plegamiento y desplegamiento de esta miniproteína en varias ocasiones.

### 2.2.1. Reversibilidad microscópica.

*Ir de N a D es como ir de D a N*

Ante la dificultad actual para encontrar N a partir de D en una simulación, hay un par de soluciones de uso común. Una es ampararse en el principio de reversibilidad microscópica, y simular el desplegamiento en lugar del plegamiento: la idea básica es que si uno ve la película "al revés", tendrá una ruta de plegamiento. Dicho principio de reversibilidad fue computacionalmente validado con una simulación de la proteína CI2 a una temperatura cercana a su  $T_m$  [20], simulación en la cual la proteína se desnaturalizó y renaturalizó a una topología nativa en 200 ns. Simular el desplegamiento tiene la ventaja de hacer un muestreo de las zonas más relevantes del paisaje conformacional, saliendo de la parte más profunda del embudo hacia el borde, en lugar de estar paseando largo tiempo en el borde antes de encontrar un camino de bajada hacia el estado nativo (ver figura 3). Así como hay múltiples rutas posibles para plegarse, uno puede suponer que también las hay para desplegarse. ¿Cuántas simulaciones son suficientes para describir las rutas de desplegamiento? Daggett y colaboradores han mostrado que se obtienen resultados equivalentes si se realizan 100, o  $\sim$ 10 simulaciones de desplegamiento [21].

### 2.2.1.1. Simulaciones a alta temperatura

Para acelerar el proceso de desplegamiento se usan dos protocolos en general. Uno consiste en simular a altas temperaturas (iguales o superiores a 498K), muy por encima de lo usado experimentalmente. Daggett y colaboradores mostraron para proteínas modelo que el subir tanto la temperatura hace que la densidad de la celda de simulación disminuya (se convierte en agua líquida supercalentada) y que esto facilita el salto de barreras energéticas entre el estado nativo, los intermediarios y el desnaturalizado, sin modificar el paisaje conformacional [22]. Prácticamente lo que se hace es colocar a la proteína en forma nativa dentro de una celda de simulación muy grande (de manera que tenga espacio para desnaturalizarse) y se agrega tanta agua como se necesite para tener la densidad correcta para la fase líquida a altas temperaturas. Por ejemplo, para simular a 298K, se ajusta a una densidad de 0.997 g/ml, para 498K a 0.829 g/ml y para 573K a 0.717 g/ml. Las simulaciones se hacen en condiciones de temperatura y volumen constante, aunque también es posible hacerlas en el ensamble NPT.

Para simulaciones a alta temperatura, otra opción son las simulaciones de intercambio de réplica (REMD, por sus siglas en inglés), que son una combinación de dinámica molecular con Monte Carlo [23]. En este caso, se generan entre 40 y 50 réplicas del sistema de simulación en el estado desnaturalizado o nativo, y se asignan temperaturas que varían pocos grados entre réplicas vecinas, cubriendo el intervalo de temperaturas en las que se espera ocurra el plegamiento/desplegamiento. La diferencia en temperaturas entre réplicas se elige de manera que la distribución de energías entre réplicas vecinas traslape suficientemente como para que en promedio se acepte

un cambio de réplica con un 20% de probabilidad, lo cual requiere simulaciones cortas (del orden de 0.5 ns) de cada réplica por separado y la determinación de la distribución de energías. En cada réplica se corre una dinámica molecular, y después de un cierto tiempo cercano a los 2 ps, se pregunta si conviene intercambiar las temperaturas de las réplicas entre réplicas vecinas, al azar, usando un criterio de Boltzmann; éste es el paso de Monte Carlo y para que el intercambio de réplicas sea eficiente se requiere que las distribuciones de energía de réplicas vecinas traslape. Con estos intercambios se pretende que cada réplica explore todas las temperaturas. La convergencia de estas simulaciones se monitorea contando el número de veces que la proteína adquiere la conformación nativa en función del tiempo. REMD es una técnica poderosa con la que se puede calcular el diagrama de estabilidad de proteínas pequeñas como la Trp-cage [24] (de 20 aminoácidos). Teniendo un buen monitor para distinguir conformaciones nativas de las no nativas, es posible calcular la energía libre de plegamiento en función de temperatura y/o presión:

$$\begin{aligned}\Delta G(T,P) &= G_{\text{desnaturalizada}} - G_{\text{plegada}} \\ &= -RT \ln [(1-x_{\text{plegada}})/x_{\text{plegada}}]\end{aligned}\quad (5)$$

donde  $x_{\text{plegada}}$  es la fracción de estados plegados obtenidos en la simulación para cada temperatura y presión. Si bien se ha mostrado que ésta es una buena opción para hacer un muestreo del paisaje conformacional, los pasos de Monte Carlo para intercambio de réplicas destruyen la secuencia temporal de la dinámica molecular. Deja de ser una película y además hay reportes [25] que sugieren

que no representan un ahorro computacional notable respecto a realizar alrededor de 16 simulaciones por dinámica molecular clásica a altas temperaturas.

### 2.2.1.2. Simulaciones con solutos desnaturalizantes

La otra estrategia para simular desplegamiento consiste en agregar desnaturalizantes a la celda de simulación. Existen reportes de simulaciones en las que se altera el pH (protonando aspartatos, glutamatos y/o histidinas, según el pH que se quiera simular) [26], o se agregan urea [27] o hidrocloreuro de guanidina [28]. Cabe resaltar un reporte reciente de simulaciones de desplegamiento de la proteína CI2 con urea, en el que variaron su polaridad para explorar el mecanismo de desnaturalización promovido por este agente de uso común en el laboratorio. De acuerdo a este estudio, el efecto desnaturalizante de la urea está relacionado a su interacción con los grupos hidrofóbicos de la proteína [29], en lugar de competir para formar puentes de hidrógeno con la cadena principal.

### 2.2.2. Fuerza bruta implementada con protectores de pantalla

La otra solución ha sido usar cómputo distribuido, ahora sí para estudiar el proceso de plegamiento directamente. En este caso no se hace una simulación muy larga (del orden de 10  $\mu$ s) sino muchas simulaciones (del orden de  $10^4$ ) de tiempos más modestos, del orden de 200 ns, partiendo de diferentes estructuras correspondientes al ensamble desnaturalizado. Las simulaciones corren como protectores de pantalla en los tiempos de ocio de las

computadoras personales de todo el mundo (por ejemplo, folding@home [30]). Esto es lo más cercano que se tiene a "observar" el plegamiento de una colección de moléculas químicamente idénticas, en un ambiente idéntico, pero partiendo de conformaciones diferentes. La razón por la cual funciona esta estrategia de muestreo es que para una proteína que sólo tiene dos estados (D y N), y que además pasa más tiempo en D o N que el tiempo que le toma cruzar la barrera energética que conecta estos estados, la probabilidad de cruzar la barrera se expresa como:

$$P(t) = 1 - e^{-kt} \quad (6)$$

donde  $k$  es la velocidad de plegado. En el límite de  $t \ll 1/k$ , esto se simplifica a  $P(t) \approx kt$  y entonces, de acuerdo a la distribución de Poisson, la tasa de plegamiento se obtiene como sigue:

$$k = N_{\text{plegadas}} / (t \cdot N_{\text{total}}) \pm \sqrt{N_{\text{plegadas}}} / (t \cdot N_{\text{total}}). \quad (7)$$

Por ejemplo, si se corren 10000 simulaciones ( $N_{\text{total}}$ ) de 20 ns de duración y 15 de ellas logran cruzar la barrera ( $N_{\text{plegadas}}$ ), entonces se obtiene una predicción para la tasa o velocidad de plegamiento  $k = 0.075 \pm 0.019 \mu\text{s}^{-1}$ , lo cual corresponde a un tiempo de plegamiento de alrededor de 13  $\mu\text{s}$  [31]. Con este enfoque no sólo se obtienen rutas posible de plegamiento, sino una aproximación al paisaje conformacional que rige el proceso. Colectando todas las conformaciones generadas en las múltiples simulaciones, se puede mostrar que se ha llegado al equilibrio, y por lo tanto, reconstruir todos los estados visitados así como las tasas de interconversión entre ellos; es decir, se obtiene toda la cinética y termodinámica del proceso.

### 2.3. La conexión entre in silico e in vitro: ¿qué mido?

En principio, a partir de una simulación por dinámica molecular uno puede calcular cualquier propiedad macroscópica que sea expresable en términos de las coordenadas y/o velocidades de las partículas [32]. Sin embargo, no todo lo calculable es informativo. En una simulación de plegamiento y/o desplegamiento de lo que se trata es poder distinguir claramente si uno está en el estado nativo, en un intermediario, en el estado desnaturalizado o poblando el estado de transición entre cualquiera de estos estados [33]. Las variables más socorridas para monitorear son el porcentaje de contactos nativos ( $Q$ ), el porcentaje de estructura secundaria nativa y si ya se adquirió la topología correcta del estado nativo. También se ha utilizado la energía, pero esto sólo es un descriptor adecuado si se tiene una función de energía libre; la gran mayoría son funciones de energía interna nada más, y por lo tanto no toman en cuenta la entropía.

¿Cómo se identifican los estados visitados durante la simulación? La estrategia más sencilla consiste en calcular la raíz de la distancia cuadrática promedio entre las coordenadas de cada pareja de estructuras generadas en la simulación; mientras la proteína esté oscilando dentro de un mínimo del paisaje conformacional, la distancia entre estructuras será pequeña. Otra opción es usar una colección de propiedades estructurales, con la que se construye un espacio de propiedades y se calcula la distancia entre conformaciones en este espacio [34]. Sobre esta colección de distancias se aplican algoritmos de *clustering* o agrupamiento. Cada grupo corresponde a un estado, y los puntos de salida de un estado a otro son los ensambles de estado de transición. Como lo que se tiene es una secuencia temporalmente ordenada de coordenadas, una

definición operativa para armar el ensamble de estado de transición es considerar el grupo de coordenadas generadas en los últimos 5 ps de estancia en cada estado estable. Como los tiempos típicos de integración para las ecuaciones de movimiento para simulaciones con todos los átomos es del orden de 2 fs, esto da una colección de ~1000 estructuras sobre las cuales se calculan monitores estructurales y energéticos.

¿Cómo saber que de verdad las estructuras seleccionadas corresponden al ensamble del estado de transición? Recordemos que experimentalmente podemos medir la diferencia de energía entre los estados estables, y entre éstos y el estado de transición que los conecta (figura 4), por lo que las simulaciones son útiles si podemos establecer una correspondencia inequívoca entre los estados que se miden en el laboratorio y aquellos visitados durante la simulación. Identificar correctamente el estado de transición permite hacer ingeniería sobre la proteína para generar variantes que se pliegan más rápido, por ejemplo. Para una proteína de dos estados, si la estructura corresponde al estado de transición, por definición tiene un 50% de probabilidad de ir hacia el estado nativo y el otro 50% de ir hacia el estado desnaturalizado. El experimento computacional obvio es tomar las estructuras identificadas a partir de la matriz de distancias descrita arriba y simularlas en condiciones de plegamiento varias centenas de veces cada una, durante decenas de ns, preguntando al final de la simulación si llegó al estado nativo. La variable  $P_{\text{fold}}$  mide la probabilidad de llegar al estado nativo y si partimos del estado de transición, debe valer 0.5 [35]. Ahora el asunto por definir es si ya se llegó al estado nativo y para esto necesitamos muchos monitores estructurales.

### 2.3.1. Monitores conformacionales

De la larga lista de propiedades calculables, las siguientes han mostrado ser útiles para distinguir tanto estados estables como los de transición [34, 35]: número total de contactos, número de contactos nativos, número de contactos no nativos, número de puentes de hidrógeno, número de contactos hidrofóbicos, número de interacciones entre residuos cargados, porcentaje de estructura secundaria, área hidrofóbica expuesta al solvente y área de cadena principal expuesta al solvente. Si bien el radio de giro es una propiedad fácilmente medible en el laboratorio y en la dinámica molecular, en las simulaciones resulta un pobre descriptor del proceso de plegado ya que las distribuciones de valores de radio de giro para el estado nativo y el desnaturalizado traslapan. Para que un monitor sea un buen descriptor, idealmente la distribución de valores de dicho monitor no debe traslapar para los distintos estados.

Como puede verse de la lista de monitores, varios de ellos requieren de criterios específicos para calcularlos. Un caso claro es el de los contactos: ¿qué tan cerca tienen que estar dos átomos para que se les considere en contacto? Típicamente se supone que los centros atómicos deben estar aproximadamente a una distancia equivalente a la suma de sus radios de van der Waals (algo cercano a 5 Å). Nótese lo difuso de la definición; cada grupo de investigación prueba qué tan sensibles son sus resultados dependiendo de la rigidez de la definición de contacto. En general, mientras la distancia no aumente tanto que una tercer partícula pueda meterse entre el par de átomos, los resultados son razonablemente estables frente a cambios en la definición de contacto. Algo semejante ocurre con la definición de estructura secundaria. Dado

que la cadena principal está en movimiento constante, en general se toleran variaciones en los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  del orden de  $35^\circ$ .

### 2.3.2. Comparación directa con experimentos

La conexión con experimentos más directa que se puede hacer es con el intercambio de protones entre la proteína y el solvente y con los valores  $\phi$  descritos arriba. Recordemos que un protón de la proteína sólo puede ser eficientemente intercambiado por uno del solvente si el protón está expuesto al solvente y no está formando un puente de hidrógeno con otro átomo de la proteína. Tanto la exposición al solvente como la participación en puentes de hidrógeno son sencillas de calcular para las estructuras generadas en la dinámica molecular. El área accesible al solvente se calcula rodando una esfera del tamaño de una molécula de agua ( $1.4 \text{ \AA}$  de radio) sobre la proteína, formando una nueva superficie con los centros de la esfera conforme rueda sobre la proteína, cuya área se calcula de forma analítica [36]. La existencia de puentes de hidrógeno se determina con un criterio de distancia entre el hidrógeno y el átomo electronegativo vecino (típicamente debe ser  $\leq 2.4 \text{ \AA}$ ), más la restricción de que el ángulo formado por los dos átomos electronegativos y el protón debe ser cercano a  $180^\circ$  para sólo tomar en cuenta los puentes más estables energéticamente. Estas dos propiedades (área accesible al solvente y presencia de puentes de hidrógeno) se pueden calcular a lo largo de toda la simulación, y son un buen monitor de los arreglos que sufre la proteína en el proceso de (des)plegamiento.

Los valores  $\phi$  proporcionan información sobre el estado de transición (ver la figura 4), mediante mutaciones

puntuales que funcionan como monitores estructurales locales. En las simulaciones no se hacen mutantes. Una vez identificadas las estructuras correspondientes al ensamble del estado de transición como describimos arriba, se calculan sobre éstas las fracciones de estructura secundaria ( $S_2^\circ$ ) y terciaria ( $S_3^\circ$ ) y se define la estructura local [37] como

$$S = (S_2^\circ)(S_3^\circ). \quad (8)$$

Esta definición permite una separación de los efectos de la cadena principal y del empacamiento de la cadena, lo cual facilita la interpretación de los valores  $\phi$  obtenidos experimentalmente. Para los casos ideales de  $S = 0$  o  $1$ , la interpretación estructural de  $S$  es exactamente la misma que para  $\phi$ . Para valores fraccionarios es útil examinar las contribuciones secundaria y terciaria por separado para entender la estructura del estado de transición. Otra manera de construir  $S$  es con el promedio de  $S_2^\circ$  y  $S_3^\circ$  [37]; la utilidad de esta otra definición no ha sido extensamente probada, y para el caso de CI2, no es tan útil como la ecuación 8. Sin embargo, para proteínas que no se pliegan estabilizando simultáneamente estructura secundaria y terciaria, puede resultar útil.

La fracción de estructura secundaria nativa en el estado de transición alrededor del residuo  $i$  se toma como el promedio para los residuos  $i-1$ ,  $i$  e  $i+1$ . Para elementos de estructura secundaria regular como hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  se toman los valores de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  definidos por el mapa de Ramachandran con un margen de tolerancia. Para el resto de las regiones de la proteína se considera que están en el estado nativo si los valores de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  en esa zona están dentro de  $35^\circ$  del valor promedio calculado para el estado nativo (ya sea en



una simulación o de un conjunto de estructuras determinadas por resonancia magnética nuclear).

La fracción de estructura terciaria se calcula como el cociente del número de contactos terciarios de un residuo en el estado de transición y el número de contactos que hace ese mismo residuo en el estado nativo. Los contactos terciarios se definen como el número de contactos de van der Waals que el residuo de interés hace con átomos de residuos separados al menos dos posiciones del residuo en evaluación. Los contactos en el estado de transición pueden ser nativos o no nativos.

La correlación entre los valores de  $S$  y  $\phi$  es buena si la proteína se pliega armando simultáneamente la estructura secundaria y la terciaria, como es el caso de CI2, la cual aparentemente sigue el mecanismo de nucleación/condensación [9]. Esta correspondencia permite identificar los pasos clave en la ruta de plegado, y por lo tanto la optimización de la velocidad de plegado.

### 3. APLICACIONES Y PERSPECTIVAS

A medida que nuestro conocimiento sobre el paisaje conformacional de las proteínas aumenta, aumentan también sus posibles aplicaciones. A continuación nos referiremos a dos áreas en las que esperamos grandes contribuciones en el futuro: el estudio del plegamiento anómalo y el diseño de proteínas.

#### 3.1. Enfermedades de plegamiento y amiloides

Durante mucho tiempo se pensó que el estado nativo era el único macroestado de mínima energía. Hoy sabemos

que en el paisaje conformacional de las proteínas existe otro estado de mínima energía, llamado amiloide, caracterizado por la formación de estructuras poliméricas lineales. Estas fibras son estables a la temperatura y ante la presencia de concentraciones moderadas de agentes caotrópicos. Las fibras amiloides se observaron inicialmente en una decena de patologías como los padecimientos de Alzheimer y de Parkinson, la diabetes tipo II y las encefalopatías espongiiformes. Hoy es claro que independientemente de la estructura observada en el estado nativo, mediante la manipulación de las propiedades del solvente, prácticamente cualquier proteína puede adoptar una conformación amiloide, caracterizada por la formación de una estructura  $\beta$  extendida intermolecular [38]. Las escalas temporales requeridas para la maduración de amiloides son mayores a minutos, por lo que las metodologías teóricas y experimentales utilizadas para estudiar este fenómeno son diferentes a las requeridas para estudiar el plegamiento al estado nativo. Sin embargo, se desconoce la estructura de los estados de transición e intermedios que conducen a la autoasociación amiloide; por lo tanto, la metodología reseñada en este capítulo es en principio aplicable para el estudio de estos conformeros. En el futuro cercano, la comparación de las regiones del paisaje conformacional que conducen al amiloide con las comarcas visitadas en el plegamiento al estado nativo seguramente nos brindarán información con relevancia clínica.

#### 3.2. Diseño de proteínas

En el plegamiento de proteínas nos preguntamos: ¿qué estructura tridimensional adoptará esta secuencia de amino-

ácidos? En el diseño de proteínas, también conocido como plegamiento inverso, la pregunta es: ¿qué secuencia de aminoácidos es compatible con la estructura tridimensional deseada?

Las grandes incógnitas que aún existen en el plegamiento no han impedido el desarrollo exitoso del diseño de proteínas. Recientemente se han reportado algoritmos capaces de diseñar, a partir de proteínas conocidas, variantes más activas o estables. También se ha logrado el diseño exitoso de proteínas cuyo patrón de plegamiento no había sido observado previamente en la naturaleza [39].

### 3.3. ¿Qué nos depara el futuro?

En los últimos años se han generado grandes avances en la precisión de los campos de fuerza empleados y en el desarrollo de algoritmos de integración más estables y eficientes. Estas mejoras, sumadas al desarrollo de procesadores más rápidos y al uso de cómputo distribuido, han aumentado considerablemente la capacidad de los cálculos *in silico*. El objetivo a mediano plazo es el estudio del plegamiento *ab initio*, esto es, la predicción computacional del estado nativo de cualquier proteína a partir de la estructura primaria. La solución del problema de plegamiento de proteínas permitirá la anotación estructural y funcional de los genomas y facilitará enormemente el diseño de fármacos al acelerar la obtención de la estructura de proteínas blanco. Creemos que la combinación imaginativa de datos experimentales y técnicas de simulación como las descritas en este capítulo, tendrán un papel central en la creación de un microscopio molecular teórico/experimental que nos permita explorar a voluntad el paisaje conformacional de las proteínas.

## REFERENCIAS

1. K. A. Dill, S. B. Ozkan, M. Scott Shell y T. R. Weikl, The protein folding problem, *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 289-316 (2008).
2. C. B. Anfinsen, Principles that govern the folding of protein chains, *Science* **181**, 223-230 (1973).
3. V. N. Uversky, C. J. Oldfield y A. K. Dunker, Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept, *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 215-46 (2008).
4. A. R. Fersht, *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*, New York, W. H. Freeman and Co. (1999).
5. K. A. Dill y H. S. Chan, From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 10-19 (1997).
6. M. Oliveberg y P. G. Wolynes, The experimental survey of protein-folding energy landscapes, *Quat. Rev. Bioph.* **38**, 245-288 (2005).
7. S. S. Plotkin y J. N. Onuchic, Understanding protein folding with energy landscape theory. Part I: Basic concepts, *Quat. Rev. Bioph.* **35**, 111-167 (2002).
8. V. Muñoz, Conformational dynamics and ensembles in protein folding, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 395-412.
9. V. Daggett y A. R. Fersht, Is there a unifying mechanism for protein folding?, *TIBS* **28**, 18-25 (2003).
10. R. D. Schaeffer, A. Fersht y V. Daggett, Combining experiment and simulation in protein folding: closing the gap for small model systems, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 4-9 (2008).
11. M. Vendruscolo y C. M. Dobson, Towards complete descriptions of the free-energy landscapes of proteins, *Phil. Trans. R. Soc. A* **363**, 433-452. (2005).
12. C. G. Benítez-Cardoza, Intercambio hidrógeno-deuterio en equilibrio, detectado por 2D-RMN para estudiar conformaciones tempranas del plegamiento y desplegamiento de proteínas, en *La física biológica en México: temas selectos*, L. García-Colín, L. Dagdug, P. Miramontes, A. Rojo, coordinadores, El Colegio Nacional, México D. F. (2006).
13. W. F. van Gunsteren *et al.*, Biomolecular modeling: goals, problems, perspectives, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4064-92 (2006).
14. C. Clementi, Coarse-grained models of protein folding: toy models or predictive tools?, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 10-15 (2008).

15. S. Miyazawa y R. L. Jernigan, How effective for fold recognition is a potential of mean force that includes relative orientations between contacting residues in proteins?, *J. Chem. Phys.* **122**, 024901 (2005).
16. S. Wu, P.I. Zhuravlev y G.A. Papoian, High resolution approach to the native state ensemble kinetics and thermodynamics, *Biophys. J.* **95**, 5524-32 (2008).
17. Y. Duan y P. A. Kollman, Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution, *Science* **282**, 740-4 (1998).
18. P. L. Freddolino, F. Liu, M. Gruebele y K. Schulten, Ten-microsecond molecular dynamics simulation of a fast-folding WW domain, *Biophys. J.* **108**, L75-7 (2008).
19. S. Honda *et al.*, Crystal structure of a ten-amino acid protein, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15327-31 (2008).
20. R. Day y V. Daggett, Direct observation of microscopic reversibility in single-molecule protein folding, *J. Mol. Biol.* **366**, 677-86 (2007).
21. R. Day y V. Daggett, Ensemble versus single-molecule protein unfolding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13445-50 (2005).
22. R. Day, B. J. Bennion, S. Ham y V. Daggett, Increasing temperature accelerates protein unfolding without changing the pathway of unfolding, *J. Mol. Biol.* **322**, 189-203 (2002).
23. Y. Sugita y Y. Okamoto, Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding, *Chem. Phys. Lett.* **314**, 141-51 (1999).
24. D. Paschek, S. Hempel y A. E. García, Computing the stability diagram of the Trp-cage miniprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 17754-9 (2008).
25. D. A. C. Beck, G. W. N. White y V. Daggett, Exploring the energy landscape of protein folding using replica-exchange and conventional molecular dynamics simulations, *J. Struct. Biol.* **157**, 514-23 (2007).
26. W. Gu, *et al.*, Molecular dynamics simulation of the unfolding of the human prion protein domain under low pH and high temperature conditions, *Biophys. Chem.* **104**, 79-94 (2003).
27. D. A. C. Beck, B. J. Bennion, D. O. V. Alonso y V. Daggett, Simulations of macromolecules in protective and denaturing osmolytes: properties of mixed solvent systems and their effects on water and protein structure and dynamics, *Methods Enzymol.* **428**, 373-96 (2007).
28. C. Camilloni *et al.*, Urea and guanidinium chloride denature protein L in different ways in molecular dynamics simulations, *Biophys. J.* **94**, 4654-61 (2008).
29. M. C. Stumpe y H. Grubmüller, Polar or apolar —the role of polarity for urea-induced protein denaturation, *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000221 (2008).
30. V. S. Pande *et al.*, Atomistic protein folding simulations on the submillisecond time scale using worldwide distributed computing, *Biopolymers* **68**, 91-109 (2002).
31. C. D. Snow, E. J. Sorin, Y. M. Rhee y V. S. Pande, How well can simulation predict protein folding kinetics and thermodynamics? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 43-69 (2005).
32. M. P. Allen y D. J. Tildesley, *Computer simulation of liquids*, Oxford Science Publications (1994).
33. D. A. C. Beck y V. Daggett, Methods for molecular dynamics simulations of protein folding/unfolding in solution, *Methods* **34**, 112-20 (2004).
34. K. A. Scott *et al.*, The folding pathway of spectrin R17 from experiment and simulation: using experimentally validated MD simulations to characterize states hinted at by experiment, *J. Mol. Biol.* **359**, 159-73 (2006).
35. D. A. C. Beck y V. Daggett, A one-dimensional reaction coordinate for identification of transition states from explicit solvent Pfold-like calculations, *Biophys. J.* **93**, 3382-91 (2007).
36. B. Lee y F. M. Richards, The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400 (1971).
37. V. Daggett *et al.*, Structure of the transition state for folding of a protein derived from experiment and simulation, *J. Mol. Biol.* **257**, 430-40 (1996).
38. F. Chiti y C. M. Dobson, Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease, *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333-366 (2006).
39. D. Baker, Prediction and design of macromolecular structures and interactions, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **361**, 459-63 (2006).

## CAPÍTULO 9 BIOINFORMÁTICA

ARTURO ROJO DOMÍNGUEZ \*

*Departamento de Ciencias Naturales*

*Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa*

### 1. INTRODUCCIÓN

Existe dificultad para definir campos de trabajo muy dinámicos, pues su continuo desarrollo hace que las definiciones de su ámbito de acción pronto se hagan obsoletas; tal es el caso de la bioinformática. Estrictamente es la aplicación de métodos y tecnología computacional para resolver problemas biológicos. En su origen, estaba centrada en el almacenamiento, manipulación y estudio de secuencias biológicas, fueran éstas de nucleótidos o de aminoácidos, los cuales forman respectivamente cadenas de ácidos nucleicos o de proteínas. A principios de este siglo [1] se propuso una definición más amplia, en donde se le veía como una ciencia interdisciplinaria que involucraba a la biología, computación, estadística y matemáticas para analizar información de secuencias y estructuras biológicas, del contenido de genomas, así como para predecir la función y propiedades de macromoléculas. En cualquiera de los casos, la descripción del campo está estimulada por los adelantos tecnológicos del momento que generan nuevas necesidades, posibilidades y nichos de investigación.

\* arojo@correo.cua.uam.mx

En la primera definición tuvo injerencia la revolución de la genética en los años 50's y 60's del siglo XX, la cual produjo las primeras secuencias de genes, en una cantidad que crece exponencialmente desde entonces. Esa revolución coincidió con la de la electrónica y la computacional, y ya conocemos el cambio tecnológico que esto generó. En el segundo caso, tenemos el gran desarrollo de la biotecnología y las explosiones crecientes en el número de nuevas estructuras tridimensionales de proteínas, de genomas secuenciados completamente y de la revolución de los -omas; esto es, de la información total de un tipo de moléculas fenómenos en un organismo. Así, es previsible que muy pronto veremos nuevos alcances y traslapes de la bioinformática, cubriendo cada vez más campos como el farmacéutico, el alimenticio y múltiples aplicaciones comerciales y tecnológicas.

A pesar de lo elusiva que parece ser la definición de la bioinformática, hay tópicos o retos centrales que son emblemáticos de esta disciplina, y que con variantes y adaptaciones constituyen herramientas y sitios comunes de metodologías más sofisticadas. En este capítulo se describen algunos de esos problemas centrales, se muestran sus aplicaciones y se concluye con algunos consejos para incursionar en el campo.

## 2. LOS RETOS CENTRALES

Dentro de los tópicos representativos de la bioinformática se encuentra el acceso y aprovechamiento de las bases de datos biológicos, la búsqueda y alineamiento de secuencias, los campos de fuerza con sus aplicaciones en la energética y el modelado tridimensional de bioestructuras.

### 2.1. Bases de datos

En los organismos vivos existe una amplia variedad de tipos de moléculas: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, metabolitos, etcétera. De cada uno de ellos existen miles de variantes y, cuando pudieron ser estudiados de forma sistemática, fue necesario crear una estrategia para compartir la información que se producía en las diferentes instituciones del mundo, así surgió la creación de bancos de datos de acceso público, con la posibilidad de consultar su contenido y depositar nueva información. Sin embargo, entre más grande y complejo es el banco, se requieren herramientas más poderosas para comparar, analizar y explotar la información. A un banco con utilerías añadidas (por ejemplo para realizar búsquedas complejas y generación de figuras y gráficas) se le llama base de datos. Una característica importante y frecuente de estas bases es que cada elemento de ella tiene comentarios (algunas veces traducido del inglés *annotations* como anotaciones).

Veamos a manera de ejemplo el GenBank [2], que contiene las secuencias de todos los genes que se van determinando. Un tiempo antes a la fecha de la edición de este capítulo (abril 2010) el tamaño de la base era de más de 119 millones de genes, que corresponden a 114 mil millones de nucleótidos.\*\* Estos dos números se mencionan aquí para tener idea del tamaño del conjunto de datos, que justifica plenamente contar con tecnología computacional para albergarla y consultarla; también porque podemos dividir ambos números para extraer información de esa base, calculando que cada gen tiene una longitud promedio de unos mil nucleótidos.

\*\* Los valores son actualizados cada dos meses en la página de internet <ftp.ncbi.nih.gov/genbank/gbrel.txt>

Los nucleótidos representan una unidad estructural del ADN y hay sólo cuatro tipos de ellos representados con las letras A, C, T y G. Entonces, un gen se representa con una secuencia o cadena de estas letras en un orden especial, y lo que acabamos de calcular nos dice que en promedio necesitamos mil letras (unos 18 renglones de esta página, es decir, más de media página) para representarlo como texto en papel. La naturaleza codifica así su información y para extraerla utiliza tripletes de esas letras llamados codones. Cada conjunto de tres letras representa para la maquinaria celular a un aminoácido que debe incluirse a la proteína en construcción. Por lo anterior, podemos decir que las proteínas promedio deben ser de unos 320 aminoácidos. De estos últimos existen veinte tipos, y cada uno es representado también con una letra del alfabeto; por ejemplo, el codón GTA corresponde al aminoácido valina o V.

Existen 64 combinaciones de tripletes y la forma en que se traduce cada uno de ellos a un aminoácido es el llamado código genético. Volviendo a la base de datos, cada segmento de un genoma puede leerse de seis diferentes formas, parte debido a que no sabemos dónde inicia el triplete y parte porque las cadenas de nucleótidos son dobles, con una cadena complementaria acoplando una G por cada C, y una A por cada T. Por ejemplo la cadena en la figura 1, tiene una complementaria (expresada debajo). Tenemos seis posibles formas de interpretar la información llamadas marcos de lectura. La primera tomaría a la cadena de arriba e interpretaría los codones como GAT, CCT, CCA, etcétera, que produce una cadena de aminoácidos particular (GAT = ácido aspártico, CCT y CCA = prolina, ...); segundo marco de lectura tomaría los codones sobre la misma cadena pero desplazados un sitio ATC, CTC, CAT, ... y el tercero TCC, TCC, ATA, ... (ver figura 1).

→ GATCCTCCATATACAACGGT →  
 ← CTAGGAGGTATATGTTGCCA ←

Figura 1. Cadenas de nucleótidos complementarias. El primer renglón representa un fragmento de ADN cuya secuencia se lee de izquierda a derecha, el renglón de abajo es un fragmento de su cadena complementaria y se lee de derecha a izquierda. Juntas forman una especie de escalera donde los postes son los renglones y los peldaños las interacciones de G con C y de A con T. En el espacio tridimensional, ésta se enrolla para formar la doble hélice. ¿Puede el lector ver esa escalera y doble hélice en la figura 3? En la primera cadena se han resaltado los codones del primer marco de lectura utilizando letras en formatos alternados grueso y delgado.

A partir de la primera cadena puede generarse la segunda, siguiendo la regla de complementaridad entre nucleótidos (A con T y G con C) y sabiendo que deben ser antiparalelas; lo que significa que avanzan en sentidos opuestos como lo indican las flechas en la figura 1. Entonces los otros tres marcos de lectura son: ACC, GTT, GTA, ...; CCG, TTG, TAT, ...; y CGT, TGT, ATA... Cada uno de los seis marcos posibles se traduce en una diferente secuencia de proteína y los seis pueden ser interpretados a partir de la cadena original pues de ella se construye la complementaria. Además de la traducción a aminoácidos, existen dos signos de puntuación: el fin de un gen que está representado por cualquiera de los codones TAA, TAG y TGA; y el inicio del mismo que siempre es ATG, aunque éste puede encontrarse también a la mitad de una secuencia y se traduce como el aminoácido metionina o M. Ahora volvamos a un proyecto de genoma, digamos el del humano que consiste en aproximadamente tres mil millones de nucleótidos, aunque sólo es interpretable cuando se detectan los sitios de inicio y fin de traducción de cada gen.

En el análisis del genoma humano sólo se han detectado del orden de 25 mil genes; que si asumimos el tamaño promedio de mil residuos, nos resulta que podría codificarse con "sólo" 25 millones de nucleótidos! Con este ejemplo podemos ver la complejidad del problema, obtener el genoma es muy difícil pero apenas aporta la materia prima para la metodología bioinformática: se requiere buscar en los 6 marcos de lectura distintos, los posibles sitios de inicio y término de los genes y predecir dónde está cada gen. ¿Y qué sucede con los miles de millones de nucleótidos que no son parte de ningún gen? Algunos están flanqueándolos y sirven de zonas de control, que determinan por interacción con el medio si un gen particular debe encenderse para producir una proteína en particular. Otros nucleótidos están como secuencias intrusas (intrones) dentro del gen, apareciendo de manera no predecible entre las regiones que sí codifican a proteínas (exones), figura 2.

La detección de intrones se hace con métodos estadísticos y estos intrones pueden aparecer entre un codón y otro o entre las bases que los forman. El ejemplo en la figura 2 sería el intrón (**luz**) que divide la palabra vida.

Avelaviluzdaestdiaacodiversoficadaguaaconsfuegoutileza  
**avelaviluzdaestdiaacodiversoficadaguaaconsfuegoutileza**  
 lavidaestacodificadaconsutileza  
 La vida está codificada con sutileza

Figura 2. Un símil literario. En la primera línea hay una frase escondida, que simula una parte del genoma. Si se identifican los intrones (en negritas en la segunda línea), éstos pueden eliminarse para tener un juego de codones potenciales que deben separarse por espacios para que tenga sentido la frase. Si los intrones son mal identificados el resultado puede hacer que la frase no tenga sentido.

Aunque se conocen las secuencias probables que flanquean a los intrones, la estadística no es determinista y sólo indica la probabilidad de que en cierto sitio exista uno de ellos. El juicio definitivo se hace recortando esas partes y tratando de ver si la secuencia resultante tiene sentido biológico, esto es, genera una cadena de longitud razonable y que al traducirse tiene a los aminoácidos en una proporción cercana a la observada en la naturaleza en promedio. No es sorprendente entonces que, a pesar de conocer el genoma, no podamos estar seguros de cuántos genes existen, sólo se pueden dar estimaciones (por ejemplo, veinte a veinticinco mil en el ser humano). Y algunos genes aunque fueran bien detectados podrían estar permanentemente apagados, reminiscencias evolutivas que es difícil descifrar. Sin duda un reto intelectual apasionante, que se dificulta por el tamaño de la cadena por interpretar. El GenBank contiene los genes identificados en todos los genomas conocidos, más los genes secuenciados individualmente, es decir, no como parte de un genoma.

Cambiamos ahora a otra base de datos que puede considerarse como clásica en bioinformática, la que almacena información sobre las estructuras tridimensionales de las proteínas, el Protein Data Bank (PDB [3]). En ella existen un poco más de 64 mil estructuras. Cada una de ellas puede contener una cadena de proteína o varias, idénticas o diferentes entre sí. La manera de almacenar esta información es en archivos con forma de tabla, donde cada renglón representa uno de los miles de átomos que forman a cada una de estas moléculas. En esa tabla existen tres columnas con las coordenadas  $x$ ,  $y$  y  $z$  de cada uno de esos átomos. En el archivo también hay información sobre la forma en que fue determinada experimentalmente esa estructura y sobre la conectividad

o enlaces que unen a los átomos que la constituyen. Cada archivo se identifica con un código formado por cuatro caracteres, muchas veces un número seguido de tres letras, y dentro del archivo cada cadena de proteína se identifica con una letra más. Una herramienta común consiste en un programa visualizador que convierte los archivos de coordenadas en un dibujo tridimensional que el usuario puede girar, acercar y manipular (figura 3).

ATOM	1	N	PRO A1134	25.876	18.873	-1.488
ATOM	2	CA	PRO A1134	25.506	18.450	-0.131
ATOM	3	C	PRO A1134	24.061	17.966	-0.091
ATOM	4	O	PRO A1134	23.290	18.307	-0.987

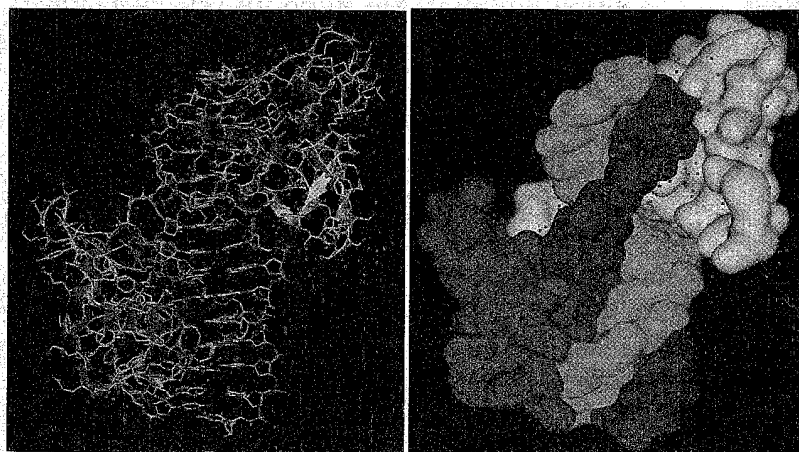


Figura 3. En la parte superior se muestra el fragmento de un archivo PDB, las tres últimas columnas contienen las coordenadas de cuatro de los 2197 átomos que forman este archivo (código 1DSZ). Abajo dos representaciones de esa misma información generadas con un visualizador. En la figura de la derecha, las moléculas con superficie roja y amarilla son proteínas, mientras que en verde y azul se muestra la doble hélice de un segmento de ADN. Los puntos rojos representan átomos de oxígeno de moléculas de agua.

Al igual que con el GenBank, podemos concluir que para aprovechar una base de datos no es suficiente el tener acceso a la información que ella contiene, sino que ésta requiere herramientas bioinformáticas para ser procesada. En el caso del PDB es necesario convertir un archivo de texto en puntos y líneas que describan la geometría de la macromolécula, prender y apagar partes de ella, girarla y acercarla, etcétera. Además, a partir de esa información se realizan los cálculos que permiten dibujar las superficies moleculares, como se ve en la figura 3. Existen muchas otras bases de datos adicionales a las de secuencias de nucleótidos y aminoácidos y a las de estructuras de proteínas, varias de ellas están dedicadas a series de compuestos de tamaño pequeño con respecto al de las proteínas. Unas de estas bases contienen la estructura tridimensional determinada experimentalmente de esos compuestos, como el Cambridge Crystallographic Data Centre [4], y otras que pueden servir como material de partida para modelar su estructura y utilizarlas en el diseño de ligandos o inhibidores (por ejemplo: zinc.docking.org). El tamaño de algunas de esas bases puede alcanzar cientos de miles de compuestos y éstos haber sido seleccionados como de potencial farmacológico. Para una lista actualizada de bases de datos de relevancia biológica se puede consultar la revista *Nucleic Acids Research*, que dedica un número especial a esta labor en enero de cada año.

## 2.2. Alineamiento de secuencias

Una labor muy común en el manejo de secuencias es compararlas. Contrario a lo que se podría esperar, esta actividad sigue siendo un problema abierto en bioinformática. Tratemos de ver por qué razón. Supongamos que



tenemos dos secuencias como las de la figura 4, cada letra representa un aminoácido o un nucleótido (muy cortas para la longitud promedio pero cómodas para este ejercicio) y deseamos colocarlas de tal forma que cada letra coincida lo mejor posible con su compañera de la otra cadena. Para poder seleccionar el mejor caso de entre los propuestos se requiere evaluar numéricamente cada uno de ellos. Una forma de hacerlo es contar el número de coincidencias o identidades: 3, 3 y 2 para los tres primeros casos, en donde no se permitió insertar espacios intermedios y 5, 3 y 7 cuando esto es posible. Recuerde el lector que cada palabra o secuencia representa una macromolécula, y que cada letra es uno de sus bloques de construcción (aminoácidos o nucleótidos). La idea que subyace en estas comparaciones es que de estar emparentadas las moléculas, una identidad de B con B significa que se encuentran en el mismo sitio estructural, o que son "equivalentes", "similares" o "correspondientes".

Surgen ya varios problemas de un caso tan simple como éste. El primero es decidir cuál es el mejor alineamiento, el segundo es decidir qué hacer con las partes de ambigüedad, por ejemplo la L en la figura 4d ¿debe ir

a)	b)	c)
BIBLIOGRAFIA	BIBLIOGRAFIA	BIBLIOGRAFIA
BIOINFORMATICA	BIOINFORMATICA	BIOINFORMATICA
d)	e)	f)
BIB-LIOGRAFIA	B--IBLIOGRAFIA	BIBLI--OGRAFI-A
BIOINFORMATICA	BIOINFORMATICA	BIO-INFORMATICA

Figura 4. Diferentes formas de alinear un par de secuencias. a), b) y c) sin permitir la inserción de espacios entre las letras de las secuencias. El resto, insertando espacios intermedios. Las identidades han sido resaltadas en letras negras.

sobre la N o moverse a la izquierda y ser equivalente a I? Y tercero, asumiendo que tenemos el mejor alineamiento, ¿cómo puede decidirse si las dos secuencias tienen parentesco?, o si por el contrario, las identidades encontradas fueron sólo fruto del azar. Para resolver el primer problema se acostumbra calcular en cada alineamiento un puntaje. Éste se determina a partir de una tabla de comparación generada de observaciones estadísticas en proteínas emparentadas y de secuencia conocida. En esa tabla está establecido cuántos puntos asignar a un alineamiento por cada A que coincide, por cada B, etcétera, y también cuántos puntos asignar o restar si *A coincide con B, con C,...*; cuántos si *B coincide con C, con D,...* Las letras más frecuentes aparecerán alineadas por azar con más probabilidad, así que a ellas se les asignan puntajes bajos, mientras que las de menor frecuencia en aparecer serían menos probables de coincidir por azar, así que tendrían mayores puntajes.

Por otra parte, cuando un aminoácido con carga negativa coincide con otro de la misma carga, genera mayor puntaje que si fuera sustituido en la otra cadena por uno hidrofóbico. Además, existe una penalización por cada inserción introducida, para evitar la sobrefragmentación de la cadena. Con esta herramienta puede evaluarse cada alineamiento y escoger el que tenga el puntaje más alto; es decir, el mayor número de coincidencias y semejanzas. Esto resuelve también el segundo de los problemas ¿la L de la figura 4d estará donde dé más puntos? Cuando las secuencias son muy parecidas no hay complicaciones mayores para alinearlas, pero cuando divergen mucho (poca similitud de secuencia entre ellas), seleccionar cuál es la mejor de las muchas tablas de comparación que existen para evaluar alineamientos se convierte ya en un problema.

Algunas de esas tablas de comparación están diseñadas para comparar secuencias cortas, otras para largas, algunas para cadenas similares, otras para las muy divergentes, etc. Asimismo, las penalizaciones causadas por la inserción de espacios son asignadas o modificadas por el usuario con base en su intuición biológica y con retroalimentación por los resultados que se van obteniendo. El tercer problema por resolver tiene que ver con la significancia estadística del puntaje; esto es, una vez que se determinó un puntaje de 5 o de 7, ¿es bueno o malo? Existe una forma de enfrentarlo, para juzgar si un puntaje es sólo fruto del azar, se realiza nuevamente la búsqueda del alineamiento óptimo pero revolviendo el orden de una de las secuencias; por ejemplo, BIBLIOGRAFIA puede convertirse en GFIBLIBAOARI, y se obtiene entonces el puntaje óptimo al alinearla con BIOINFORMATICA. Este proceso de aleatorización del orden, manteniendo la composición de aminoácidos, se repite un centenar de veces dando como consecuencia un centenar de puntajes aleatorios. A éstos se les estima la media y la desviación estándar y se calcula después a cuántas desviaciones estándar (DE) de distancia de la media se encuentra el puntaje original: a esta medida se le conoce como el valor Z (*Z-score*). Si el puntaje original se encuentra a más de 5 DE, se considera un resultado fuera de la campana de datos aleatorios y, por lo tanto, significativo. De esta manera puede decirse que las dos secuencias comparadas sí tienen parentesco y posiblemente son fruto de un ancestro común. Incluso se acostumbra calcular la probabilidad de que un puntaje pertenezca a la campana debido a su distancia a ella, lo que se denomina valor P (*P-value*).

Se encuentran probabilidades muy bajas para aquellos resultados con valores Z relativamente grandes. Así, es

a)

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 54696404 gb AAV38574.1  orosomucoid 1 [synthetic construct	415	1e-114
gi 1197209 emb CA29229.1  alpha-1-acid glycoprotein 1 precu	362	9e-99
gi 229386 prf 1720005A protein, alpha acid glyco	352	7e-96
gi 29170378 emb CAA29873.2  alpha-1-acid glycoprotein 2 precu	322	8e-87
gi 194033903 ref XP_001928762.1  PREDICTED: orosomucoid 1 [Su	245	1e-63
gi 112879 sp P21350.1 A1AG1_MUSCR RecName: Full=Alpha-1-acid	192	2e-47
gi 155624218 gb ABU24464.1  alpha 1-acid glycoprotein [Gallus	67.8	5e-10
gi 169155004 emb CAQ14093.1  novel protein [Danio rerio]	45.8	0.002
gi 124015301 gb ABH8780.1  erythrocyte membrane protein 1 IP	35.4	2.6
gi 157370851 ref YP_001478840.1  extracellular solute-binding	33.5	9.7

b)

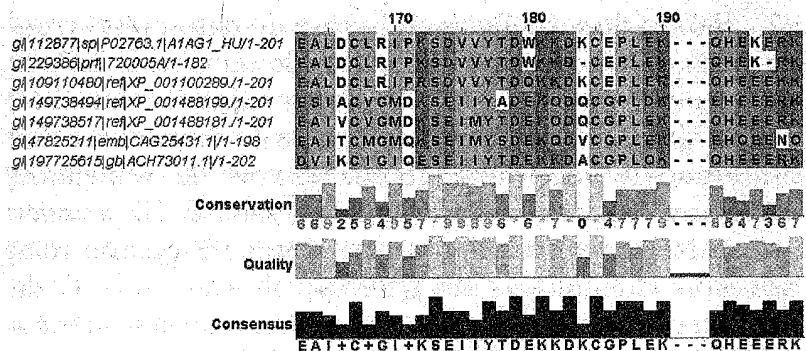


Figura 5. a) Resultado de una búsqueda de secuencias similares. Cada renglón representa una secuencia encontrada, con sus códigos de la base de datos. Las siguientes dos columnas muestran el puntaje obtenido al alinear la secuencia problema con cada una de las encontradas (azul) y el valor de esperanza (verde), utilizando un juego particular de matriz de comparación y penalización por inserciones;  $1e-63$  representa  $1 \times 10^{-63}$ . Las últimas tres secuencias no son significativas. b) Alineamiento de algunas secuencias con JalView [5], cada letra representa a un aminoácido, y los colores resaltan características de éstos; por ejemplo, azul para los hidrofóbicos y rojo para los cargados positivamente. Los histogramas de la parte de abajo muestran distintas formas de medir la similitud en cada posición, ya sea por variabilidad del aminoácido o por puntaje de la matriz de comparación. Note las posiciones variables, las conservadas y la posición de las inserciones. El último renglón muestra una secuencia representativa del conjunto de secuencias, con los aminoácidos más frecuentes de cada posición.

común ver probabilidades de  $1 \times 10^{-100}$  o incluso menores (figura 5a). Un valor P relativamente pequeño, por ejemplo una millonésima, indica un 0.0001% de probabilidad de que un alineamiento se dé al azar entre las cadenas de aminoácidos que se están comparando. Pero con el vasto crecimiento en el número de secuencias, puede no ser suficiente, por lo que se acostumbra multiplicar el valor de P por la cantidad de datos en la base. En el caso del GenBank, al multiplicar una millonésima por 96 millones de secuencias en la base de datos, nos arroja un valor de 96 secuencias posibles de ser obtenidas por azar, a pesar de tener probabilidades bajas. Este producto del valor P por el tamaño de la base de datos es el valor comúnmente reportado como criterio de semejanza estructural (figura 5a), y se le llama valor E (*Expectation value*). Nótese en esa figura que el valor E guarda relación con el puntaje (*score*) de ese alineamiento. Cada renglón representa el mejor alineamiento de la secuencia problema con una de la base.

En este punto, sería conveniente hacer una reflexión, pensemos ¿cómo se complicaría lo anterior si en lugar de palabras de unas 13 letras de longitud tuviéramos secuencias reales de unos 300 aminoácidos o de mil nucleótidos? ¿Si no quisiéramos alinear sólo dos secuencias sino cinco, cincuenta o quinientas simultáneamente? (casos comunes), o si en nuestro laboratorio se acaba de determinar una secuencia y queremos saber si es nueva o a quiénes se parece, y deseamos alinearla por separado con cada una de los 119 millones de secuencias en el GenBank.

La primera complicación ya está solucionada pues los algoritmos se encuentran optimizados para las longitudes de cadenas comunes, y con frecuencia no construyen y evalúan todos los alineamientos posibles sino que se basan en heurística y atajos de programación. Para el

alineamiento múltiple, una estrategia que se utiliza comúnmente de forma automática consiste en alinear por pares cada secuencia con todas las demás, y empieza a construir bloques (*clusters*) con base en los alineamientos de mayor puntaje [6]. Cuando al ir analizando de puntajes mayores a menores se encuentra un par de secuencias que pertenecen a distintos bloques, éstas guían la forma de unirlos, y el proceso sigue hasta que todas las secuencias quedan integradas (figura 5b). Finalmente, las búsquedas sobre todo el GenBank son rutina con BLAST [7] y tardan algunos segundos utilizando un servidor desde cualquier parte del mundo.

Para tener acceso a todos estos servidores, programas y portales a las bases de datos, es útil tener un sitio que ofrezca las ligas a todos ellos. Existen varios de estos sitios, pero uno que se mantiene desde hace mucho tiempo se encuentra en [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Allí se encuentra una liga a herramientas (*proteomics tools*) que permite hacer una enorme cantidad de tareas, entre ellas búsquedas en el GenBank con BLAST y alineamientos múltiples (Clustal W), así como servidores para modelado molecular. El lector está invitado a explorar este sitio y sorprenderse con la extensa gama de campos de la bioinformática y la variedad de herramientas gratuitas disponibles en cada uno de estos sitios.\*

### 2.3. Campos de fuerza

De la misma forma en que se requería una forma de asignar cuantitativamente un puntaje a cada alineamiento para seleccionar el mejor, se requeriré una forma de

\* La revista *Nucleic Acids Research* publica un número especial en el mes de julio de cada año, con una lista de servidores de internet (*web server issue*).

evaluar las diferentes conformaciones o rotámeros de alguna estructura molecular en particular. Una conformación es una geometría distinta de la misma molécula (los mismos átomos unidos con los mismos vecinos) que se adquiere, por ejemplo, por la rotación de un enlace sencillo (figura 6). La manera común de evaluarla es a través del cálculo de la energía del sistema, el cual se obtiene dividiendo el problema en muchos contribuyentes independientes, que primero se calculan por separado y luego se suman.

A primera aproximación, podemos considerar la evaluación de energía como una caja negra en la que se depositan las coordenadas y conectividad (enlaces) de la molécula y nos devuelve un número, casi siempre en unidades de kcal/mol, correspondiente a su energía conformacional. Internamente, esta caja negra contiene una serie de valores geométricos óptimos para cada tipo de enlace y el costo energético por no cumplirlos; estos valores

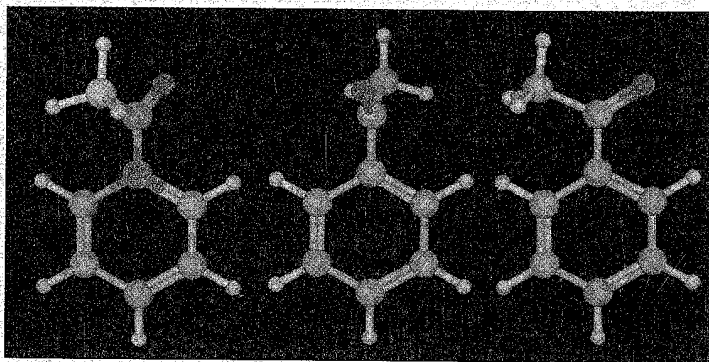


Figura 6. Tres de los múltiples conformeros posibles de la acetofenona. Cuatro de los átomos grises fueron coloreados como referencia. La rotación alrededor del enlace que une a los átomos verde y azul cambia la posición y distancias entre átomos, sin romper ni cambiar enlaces. Otro enlace que puede rotar es el que une los átomos amarillo y morado.

y costos son llamados parámetros. También contiene la forma de las ecuaciones que determinan el cálculo numérico de cada contribuyente como se describe a continuación.

Una molécula es dividida en al menos cinco tipos de contribuyentes, siendo el más simple de visualizar aquel que distorsiona las distancias de enlace. Por ejemplo, un enlace entre dos átomos de carbono de un tipo llamado alifático, tiene una distancia óptima alrededor de  $1.5 \text{ \AA}$  ( $1 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$ ). En la molécula de la figura 6, existen dos de estos enlaces: el que une a los átomos marcados con amarillo y azul y el azul-verde. Si ellos midieran más o menos de  $1.5 \text{ \AA}$  (valor óptimo), se les calcularía a cada uno el valor de esa energía de distorsión con la ecuación y parámetros mencionados. De manera equivalente, se calcularía para cada uno de los seis enlaces del hexágono (radical bencilo), para el que une el átomo rojo (oxígeno) con el resto de la molécula y para cada uno de los enlaces que unen a los pequeños átomos blancos (hidrógenos). La suma de todas estas energías de distorsión es el primero de los cinco contribuyentes.

De manera equivalente, se mediría el ángulo formado por cada juego de dos átomos unidos a uno central, por ejemplo entre los átomos naranja-verde-azul o entre amarillo-azul-verde. En general, ninguna molécula tendrá todos sus átomos con ángulos óptimos, por lo que en cada caso se calculará esa energía de distorsión, siendo el segundo contribuyente de la energía la suma de todos los valores de distorsión de enlace.

El tercer contribuyente es similar a los anteriores, pero con la rotación alrededor de enlaces sencillos, por ejemplo, la verde-azul en la figura 6. Los valores correspondientes a los otros dos contribuyentes tienen que ver con los contactos entre átomos que no están unidos a través

de enlaces covalentes. En general, cualquier par de átomos no enlazados van a atraerse conforme se acercan, debido a una dispersión de sus nubes electrónicas. Cuando llegan a cierta distancia, esa energía se encuentra en el valor mínimo, y cualquier acercamiento ulterior tiene una consecuencia en energía. Esta interacción se conoce como van der Waals, y es estimada para cada par de átomos no enlazados y sumándose la de todos los pares para obtener la total. De la misma forma, cada átomo tiene una carga eléctrica parcial, la interacción coulombica entre cada par es la quinta contribución. La suma de las cinco nos arroja la energía conformacional total de la molécula. Por ejemplo, para las tres conformaciones mostradas en la figura 6, estos valores son (tabla 1):

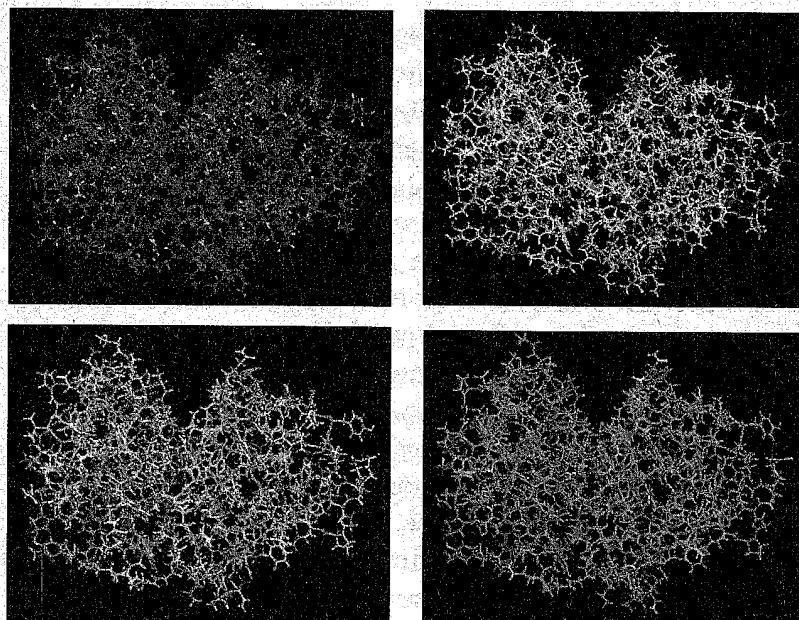
Tabla 1

Confórmero	Tipo de contribución a la energía conf.					Suma
	enlace	ángulo	rotación	vdW	coul	
izquierda	8.4	1.3	6.8	16.0	-0.04	31.8
centro	8.5	1.3	8.8	14.38	-0.03	31.1
derecha	8.4	1.3	-0.2	24.9	-0.12	33.5

De los cuales puede verse que la conformación central es la que se predice como la más estable (menor energía), y que la de la derecha tiene poco distorsionadas sus contribuciones debidas a la rotación alrededor de enlaces (energía de distorsión cercana a cero), pero con contactos muy cercanos entre átomos no enlazados al mostrar el valor más alto para contactos vdW. La tabla 1 ilustra que aún el estado más estable puede tener distorsiones respecto a los valores ideales, y es producto de un balance de

repulsiones, tensiones e interacciones favorables. En una molécula la energía conformacional no refleja sitios específicos de tensión o de baja energía, sino el resultado global final producto del balance de todas las contribuciones.

La optimización de geometría, o minimización de energía es una herramienta muy importante y utilizada, consiste en analizar una molécula como se hizo arriba y determinar la dirección en que debe moverse cada átomo para reducir la energía. Esto se realiza calculando la energía total del sistema,  $E_0$ , como en la tabla de arriba. Después, cada uno de los átomos que se desea optimizar se mueve ligeramente, apenas unas fracciones de Å en su posición horizontal,  $\Delta x$ , y se recalcula la energía del sistema completo,  $E_x$ . La variación entre energías,  $\Delta E = E_x - E_0$ , se divide por el  $\Delta x$  y se le invierte el signo al resultado, lo cual permite una estimación de la componente horizontal de la fuerza sobre el eje x. Este procedimiento se repite para los ejes vertical y perpendicular al plano y con las tres componentes conocemos la fuerza que siente el átomo en estudio (en realidad se calculó el gradiente o derivada de la energía respecto a la posición). Al repetir este conjunto de cálculos podemos estimar la dirección en que cada átomo del sistema debe moverse para reducir la energía, y con base en esa información se ajustan todas las coordenadas. Este procedimiento completo se repite una y otra vez hasta que el promedio geométrico (RMS del inglés *root mean square*) de la variación de la energía respecto a la posición, o gradiente de energía, sea más pequeña que un cierto valor predeterminado. Este valor es llamado criterio de convergencia, típicamente es de 0.001 kcal/mol para moléculas pequeñas y un orden de magnitud mayor para macromoléculas. Al alcanzarlo estaremos tan cerca de las coordenadas de un



Etapas de minimización	Energía (cal/mol $\times 10^6$ )	Gradiente promedio
inicial	+24.62	58892
7	-1.02	3765
15	-2.78	10.5
39	-4.40	2.9
54	-4.59	1.0
73	-4.72	0.5
139	-4.78	0.1
163	-4.80	0.05
249	-4.82	0.01

Figura 7. Minimización de la energía de una proteína de 212 aminoácidos (PDB: 9PAP). Los paneles representan las estructuras de los primeros cuatro renglones de la tabla. En color rojo, átomos que sufren fuerzas altas que se tornan azules conforme la energía se va reduciendo y el sistema se aproxima al mínimo de energía.

mínimo de energía como el criterio de convergencia establezca. En una proteína es posible que se requieran decenas y hasta centenas de ciclos de minimización para lograr llegar a ese punto (figura 7).

Puede verse en la figura que inicialmente el gradiente sobre casi todos los átomos es alto (color rojo) y que conforme avanzan los ciclos de minimización, rápidamente se reducen tanto el gradiente promedio como la energía. Poco a poco el proceso se hace más lento y demandante de ciclos adicionales de minimización para lograr apenas pequeñas mejoras. En la figura sólo se representan las estructuras de las cuatro primeras etapas reportadas en la tabla 1, donde la primera es el estado inicial, previo al proceso. El resto de las estructuras serían completamente azules salvo algunos pocos sitios aislados. A pesar de que el proceso de minimización de la energía es muy común, no existen sitios en internet para realizarlos, por lo que se requiere instalar un paquete de cómputo que tenga esas capacidades. Existen para ello paquetes de cómputo académicos de costo relativamente bajo, además de varias opciones comerciales.

En casi todos los paquetes computacionales, existen opciones para seleccionar un campo de fuerza particular. Los hay con parametrizaciones exclusivas para ácidos nucleicos y proteínas [8], para proteínas y grupos hemo [9], para carbohidratos [10], o para moléculas pequeñas, por ejemplo fármacos [11,12]. Se debe ser cuidadoso en esa selección para evitar tener distorsiones artificiales debido a átomos que no estén bien representados en los datos del campo de fuerza. Esta herramienta será utilizada en la siguiente sección como criterio de selección y como método para encontrar geometrías óptimas.

## 2.4. Modelado molecular de bioestructuras

A pesar del enorme número de estructuras conocidas en el PDB y que éste se encuentra en continuo aumento, muchas de ellas son variantes de la misma proteína, con algunas mutaciones, con distintas moléculas unidas o en condiciones distintas del medio. Lo más sorprendente es que algunas, aunque sean proteínas distintas en realidad muestran un patrón estructural similar, es decir no corresponden a geometrías o topologías nuevas. Desde hace un par de años no se han descubierto nuevos patrones, y de las más de 64 mil estructuras depositadas actualmente, éstos pueden clasificarse en casi 1400 patrones estructurales (figura 8).

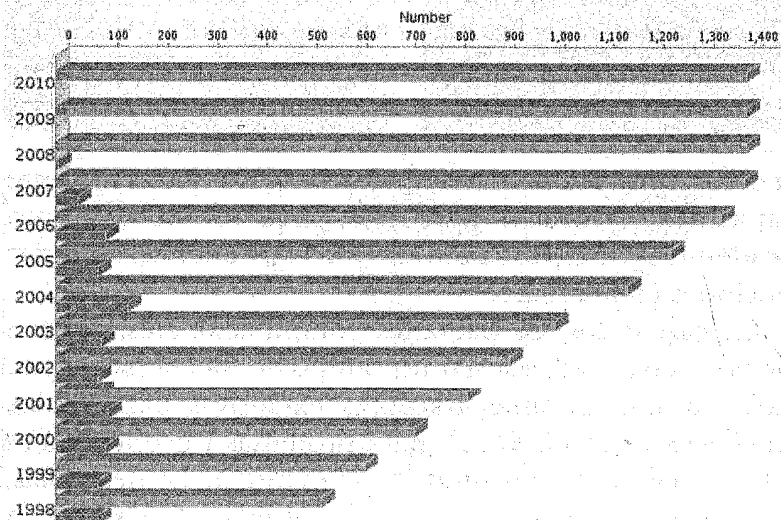


Figura 8. Fracción de la estadística del PDB. El conjunto de estructuras depositadas en esta base de datos fue clasificada de acuerdo con su topología, las barras azules muestran el número de nuevas geometrías que se producen cada año, y las barras en rosa el acumulado de geometrías conocidas totales. A pesar de que en los últimos cuatro años se ha determinado la geometría de casi 24 mil proteínas, sólo unos 50 patrones nuevos fueron observados, 46 en 2007, 6 en 2008 y ninguno en 2009 y hasta la fecha en el 2010. Tomado de la liga "PDB Statistics" de [www.pdb.org](http://www.pdb.org)

Al comparar el número de estructuras conocidas en el PDB con el número total de secuencias en el GenBank podemos concluir que para la mayoría de las proteínas de interés no existe la información tridimensional. Es allí donde el modelado molecular puede ayudar a proponer geometrías. Para ello, iniciemos con las ideas básicas para modelar una estructura de proteína formada de una sola cadena. En la figura 9 se muestra una comparación entre pares de estructuras conocidas. En el eje horizontal se representa la similitud entre las secuencias de las proteínas que se comparan, expresada como el porcentaje de residuos idénticos en el alineamiento óptimo. En el eje vertical se tiene una medida promedio de la diferencia en la posición del centro de cada uno de los aminoácidos que se comparan, medida en Å. El centro del aminoácido se define como las coordenadas del carbono alfa,

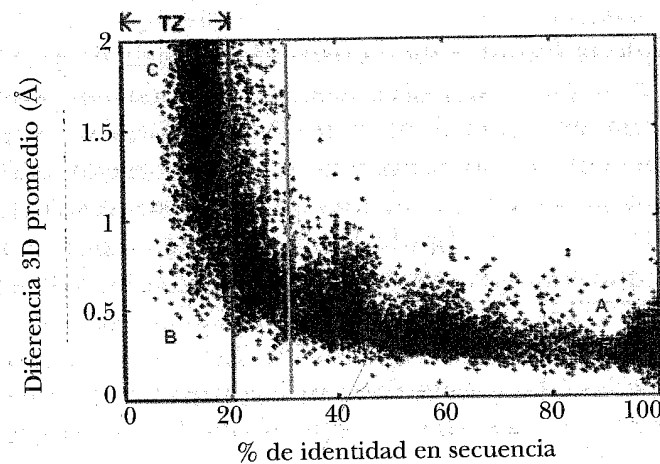


Figura 9. Comparación entre parejas de proteínas con estructura conocida. Se muestra la dependencia de la diferencia en estructura de la parte interna de las proteínas, expresada como el RMS de la distancia entre carbonos alfa equivalentes, contra el porcentaje de identidad en secuencia entre sus alineamientos. Adaptada de la referencia [13].

y en esta figura se consideran sólo los átomos de la parte interior de las estructuras; que es la que tiene mayor grado de conservación en geometría.

Los puntos en la parte inferior de esta figura corresponden a estructuras con gran parecido tridimensional, o sea, pequeña diferencia en estructura. Es interesante notar la tendencia asintótica del conjunto de puntos conforme se aproximan a la derecha, hacia la zona marcada con A. Puede afirmarse de allí que a mayor grado de identidad en secuencia, mayor parecido tridimensional, y que no hay excepciones, pues no existen puntos en la zona superior derecha de la figura. Sin embargo lo opuesto no es cierto, pues a bajo porcentaje de identidad, se puede tener tanto similitud estructural, señalada con una B en la figura, o gran divergencia tridimensional, marcada con la letra C. A la zona izquierda de la gráfica se le llama región de penumbra (TZ por *twilight zone*) donde *todo puede pasar*.

Aunque la figura 9 fue construida a partir de la comparación de pares de estructuras ya conocidas, es posible hacer una extrapolación; si tuviéramos una secuencia problema con un porcentaje de identidad mayor al 20 o 30% con la secuencia de una proteína con estructura conocida (a la derecha de las líneas roja y verde en la figura), puede esperarse similitud estructural, y la geometría conocida puede usarse como un molde para modelar sobre ella la secuencia problema. Esto permite que las coordenadas 3D de una fracción significativa de proteínas pueda ser predicha a partir de las 1200 topologías conocidas que se mencionaron en la figura 8. Con base en un alineamiento entre las secuencias problema y la de la proteína molde se determinan cuáles son los aminoácidos equivalentes, como se mencionó en la discusión de la figura 4. Las cadenas laterales del molde son reem-

plazados *in silico* por los de la secuencia por modelar hasta tener tejida la secuencia nueva sobre la estructura antigua. Las inserciones mencionadas en la figura 4 traen algunas complicaciones, si éstas se encuentran en el molde, significa que la cadena problema es más larga y tendrá que cortarse un enlace en el molde para incorporar los nuevos aminoácidos. En el caso opuesto, al molde le sobran aminoácidos que deben ser removidos. Esta es una tarea compleja que requiere trabajar de manera interactiva generar variantes de los alineamientos, utilizando distintas matrices de comparación y diferentes penalizaciones por inserción. Requiere también el análisis interactivo de la estructura 3D para determinar los mejores sitios de unión o pérdida y las mejores equivalencias de residuos en las zonas de ambigüedad, como las señaladas para la L en la figura 4d. La consecuencia de mover un aminoácido una posición a la izquierda o derecha en un alineamiento, puede ser la de orientar el nuevo residuo al interior o al exterior de la estructura. Además es muy útil el conocimiento biológico de la función o características de la proteína, para integrarlo al análisis y a la toma de decisiones. Por la complejidad de esta labor, no ha sido posible tener un programa o servidor completamente automatizado para las tareas de modelado. El proceso de reemplazo de aminoácidos también se complica por el hecho de que las nuevas cadenas pueden tener diferentes conformaciones, como los grupos unidos al anillo en la figura 6. Si la sustitución es de un aminoácido grande en el molde por uno menor en el modelo, puede utilizarse como base la conformación de la cadena original; pero no así para nuevas cadenas grandes.

En general existe un número infinito de conformaciones posibles para cada nuevo grupo pues la rotación es continua alrededor de los enlaces, pero de ellas sólo



existe un número limitado de conformaciones de baja energía, y sólo algunas de éstas son las que se han observado con frecuencia en las proteínas cuya estructura es conocida, por lo cual se han construido bibliotecas de rotámeros de cadenas laterales [14] y de contactos en el interior de las proteínas [15]. Esta información puede ser utilizada para proponer al azar alguno de los rotámeros en cada nuevo aminoácido del modelo, y una vez completados todos los reemplazos, reiniciar el proceso para construir de forma automática otros cientos de modelos posibles, todos con la secuencia problema, pero con nuevas combinaciones de rotámeros (figura 10).

Antes de seleccionar cuál es el mejor, debe realizarse una minimización de la energía para optimizar contactos y eliminar interacciones desfavorables, por ejemplo átomos que se traslapan. Se aplica entonces el procedimiento descrito en la figura 7, sólo que en tres etapas: primero dejando moverse exclusivamente a las cadenas laterales recién reemplazadas, luego todas las cadenas laterales y finalmente el total de los átomos, esto es incluyendo la cadena polipeptídica. Este esquema de optimización trata de disipar primero la tensión de las nuevas cadenas con los movimientos y ajustes entre ellas mismas sin perturbar la estructura del resto de la proteína, luego se incluye la posibilidad de movilidad a las cadenas vecinas, aunque sean las de la estructura original. Finalmente se permite el relajamiento global de todos los átomos, transformando así a la cadena principal del molde en la del modelo de la nueva secuencia. Como puede verse de la figura 9, se espera que a mayor parecido en secuencia entre el molde y el modelo, las estructuras sean más semejantes, y por lo tanto el modelo represente con mayor precisión a la estructura real.

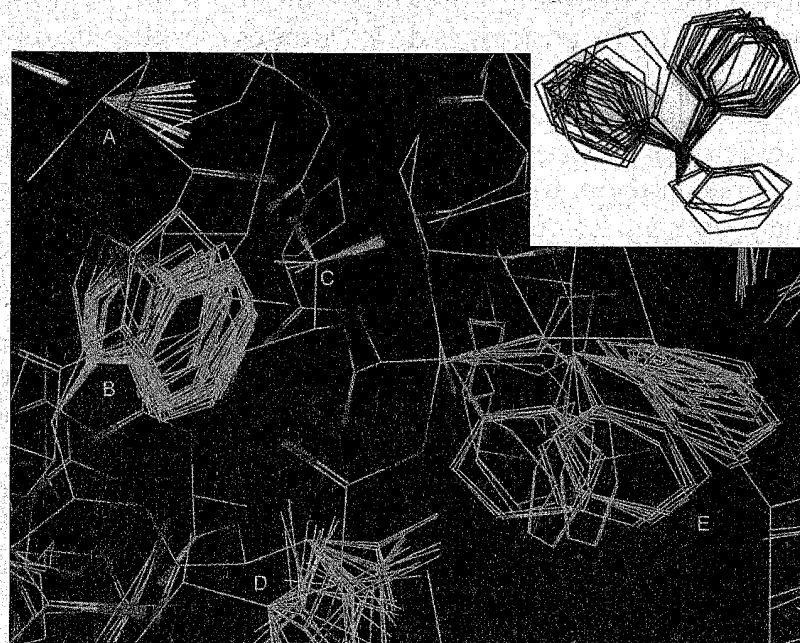


Figura 10. Rotámeros y modelos. El recuadro muestra conformaciones de la cadena lateral de la fenilalanina observadas en estructuras del PDB y cómo se agrupan preferencialmente en tres sitios. Tomado de la referencia [16]. Esas tres conformaciones forman parte de una biblioteca de rotámeros que se utiliza para modelar las nuevas cadenas de una estructura. Se muestra en la figura el traslape de veinte modelos. Las restricciones locales hacen que sólo algunos rotámeros sean compatibles, como en A, B y C, o bien que por la interacción del medio exista diversidad de posibilidades, como en D y E. Las porciones de la estructura que se muestran sin variabilidad son las partes idénticas entre el molde y la secuencia problema. Estas zonas serán perturbadas de forma distinta en cada modelo por las diferentes conformaciones de los aminoácidos que sean reemplazados cuando se realice una optimización independiente de cada modelo.

Cabe resaltar de esa misma figura que la tendencia asintótica esperada en el límite de 100% de identidad en secuencia, es decir para la misma proteína; debería ser cero en el eje y, esto es estructuras idénticas. Sin embargo,

los valores tienden aproximadamente a  $0.2\text{\AA}$ . Esta variación en las posiciones de los átomos es reflejo de distintos factores: la incertidumbre en la metodología experimental para determinar la estructura, y los efectos de a) contactos con proteínas vecinas en distintos tipos de cristalización, b) las diferentes condiciones empleadas para obtener los cristales, y c) la presencia o ausencia de ligandos en los sitios de reconocimiento de la proteína.

Existe un número importante de casos de secuencias que no pueden ser identificadas como similares a ninguna de las que tienen estructura conocida; estimado en alrededor de 30%. La ausencia de similitud imposibilita la selección de un molde para su modelado. En estos casos existe como alternativa un método conocido como hilvanado (*threading*) en el que la secuencia problema es tejida o colocada sobre uno de los más de mil patrones de proteínas conocidos (figura 8). Hay múltiples formas de colocar la secuencia problema sobre los sitios de la estructura, de forma muy similar al ejercicio de la figura 4. Cada uno se prueba y se le evalúa en función de su compatibilidad. Esta evaluación no toma en cuenta criterios de identidad o similitud en secuencia sino que utiliza la estructura tridimensional para determinar dónde quedarían los residuos cargados y los hidrofóbicos, cómo serían los contactos entre ellos y cuál el espacio disponible en el interior, además de comparar las tendencias esperadas de ciertos segmentos de la secuencia a formar estructuras secundarias — como hélices, zigzags y giros — con la estructura del posible molde (figura 11).

Se escoge el alineamiento óptimo para ese patrón de plegamiento y el procedimiento se repite para cada uno de ellos. A los mejores candidatos para ser seleccionados como estructura molde se les realiza una prueba de significancia estadística para determinar el puntaje Z, como

se describió en una sección previa, teniéndose así las propuestas de molde identificadas por compatibilidad y no por homología.

En caso de no haber moldes identificables por semejanza en secuencia o por compatibilidad, queda aún la posibilidad de intentar plegar la cadena sin molde. Esta metodología se conoce como *ab initio*, y tiene grandes posibilidades de desarrollo, aunque actualmente está limitada a casos de proteínas pequeñas y tiene una incertidumbre mayor a la que ofrece el modelado con estructuras conocidas para ser usadas como moldes, denominada en ocasiones como *knowledge based*.

Hasta el momento solamente hemos descrito el modelado de cadenas aisladas de proteínas; sin embargo, el modelado puede también predecir la estructura de

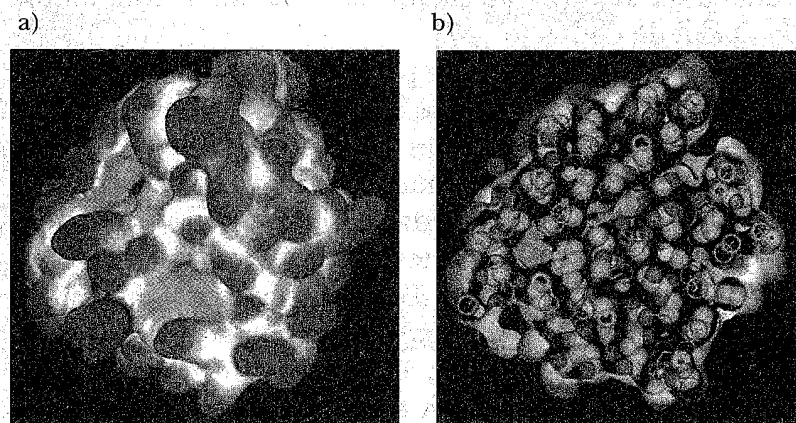


Figura 11. a) Superficie de una proteína y b) corte transversal. La superficie está coloreada para destacar las protuberancias o zonas convexas (rojo) de las concavidades, sitios potenciales de unión de ligandos (verde para superficies hidrofóbicas y azul para polares). El corte de la derecha muestra el empaquetamiento compacto de los grupos químicos en el interior. Una proteína al plegarse optimiza en su interior los contactos, quedando muy pocas cavidades y no habiendo choques o traslapes entre sus átomos.

complejos proteína-proteína y proteína-ligando. En ambos casos, los modelos más precisos son aquellos que se basan en estructuras conocidas para ser usadas como molde. Esto se realiza de una forma muy parecida a la que se acaba de describir, con la complicación de que en general no existe la biblioteca de rotámeros para el ligando, por lo que se debe construir previamente. Si no se tuviera esa información, se debe recurrir a un procedimiento conocido como simulación del acoplamiento o *docking*. En éste se ensaya la asociación entre dos moléculas buscando el sitio de contacto y la orientación relativa en que ellas pueden asociarse o unirse con la mayor afinidad. En el caso de complejos proteína-proteína, pueden modelarse ambos componentes por separado y predecir, en función de los aminoácidos que se encuentren en la superficie, cuáles son los sitios con mayor potencial de contacto [17].

Una aproximación a este procedimiento fue propuesta por Jones y Thornton [18] e implementada en el servidor SHARP<sup>2</sup> [19]. A partir de un análisis estadístico realizado sobre las superficies de contacto entre proteínas, en complejos con estructura conocida, midieron una serie de variables y determinaron los intervalos en ellas que se observan de manera frecuente. Estos intervalos fueron parametrizados y ponderados en el programa e incluyen la solvatación, hidrofobicidad, área y planaridad de la superficie, y la naturaleza de los aminoácidos que la forman, entre otras. Esta información sistematizada permite predecir cuál sitio del exterior de una proteína es el más propenso a formar interacciones con otra proteína (figura 12). Es interesante mencionar que los resultados de la parametrización son distintos para homodímeros, complejos entre la proteína problema con proteínas mayores o menores que ella, o con anticuerpos; esto podría

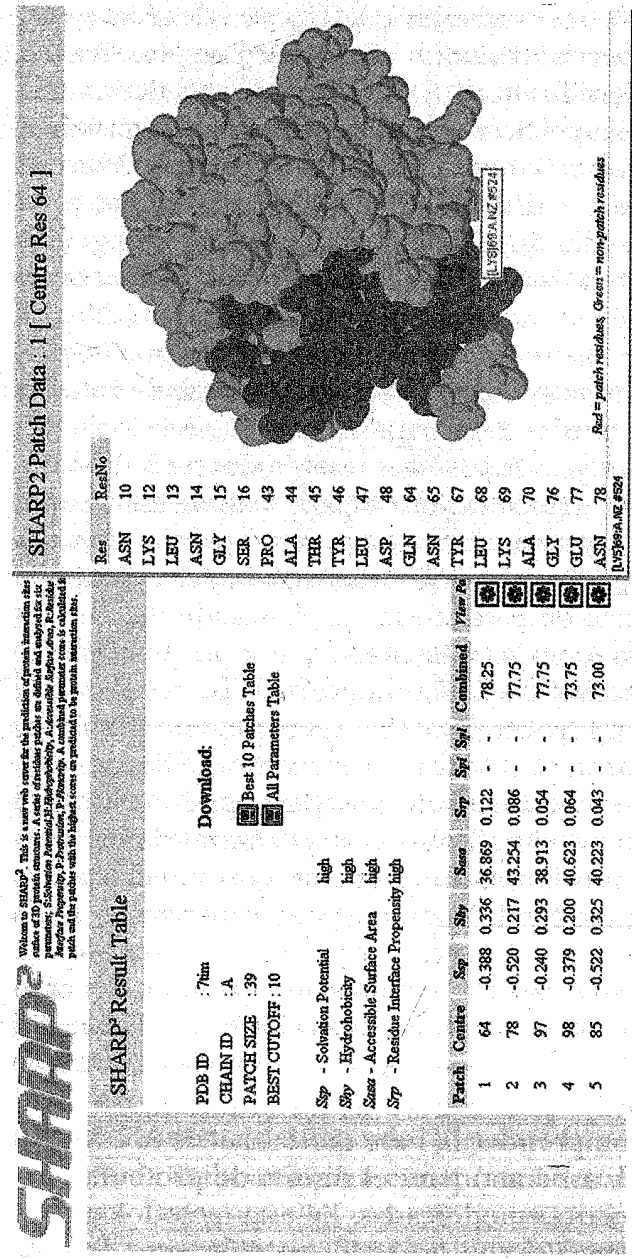


Figura 12. Información de la salida del servidor SHARP<sup>2</sup>. A la izquierda en la parte inferior se reportan las características calculadas para los seis sitios que se identificaron como de mayor probabilidad de interacción para formar homodímeros. El de mayor probabilidad se representa en la estructura de la derecha con color rojo sobre la superficie. El cursor permite identificar átomos y aminoácidos; como se muestra en uno de ellos. A la izquierda de la molécula se enlistan los aminoácidos que forman el sitio propuesto (parche sobre la superficie).

interpretarse como variantes que la naturaleza ha generado para el reconocimiento eficiente entre proteínas.

Una vez identificados los sitios potenciales de interacción sobre la superficie de ambas proteínas, se prueban diferentes orientaciones relativas. Asumiendo que las dos proteínas que se van a asociar son cuerpos rígidos, y dejando una de ellas fija en el espacio, existirían seis grados de libertad de la otra para trasladarse y rotar para explorar posibilidades y encontrar el mejor contacto. Nuevamente aparece la necesidad de evaluar a cada una de esas posiciones relativas, con un campo de fuerza de interacción intermolecular, o su equivalente, y seleccionar los mejores complejos. Existen varios métodos en la literatura [17, 20, 21] y sitios en la red para realizar ese tipo de predicciones, basta utilizar Google para buscar "*protein-protein docking*". La precisión de los resultados es limitada por la dificultad de pasar de la aproximación de cuerpos rígidos a la de superficies flexibles, que se adaptan mutuamente a la presencia e interacciones de la proteína vecina, y es un tema de frontera y debate actualmente [22, 23].

Los dos párrafos anteriores estuvieron dedicados a la interacción entre macromoléculas proteicas, sin embargo hay avances muy significativos en el campo de la simulación de la asociación de proteínas con moléculas pequeñas [24], en donde hay cientos de programas y sitios *web* para enfrentar diferentes aspectos del diseño de ligandos [25]. El *docking* proteína-ligando se utiliza en gran medida en la primera etapa del diseño de fármacos, aunque también se puede aplicar en la búsqueda de inhibidores, en la exploración de sitios activos y de transporte para comprender la base molecular de la afinidad y selectividad, así como para el diseño de proteínas con estas características modificadas. En esta metodología los ligandos potenciales son probados en diferentes orienta-

ciones sobre una cavidad de la superficie de la proteína, para una descripción más detallada en español puede consultarse la referencia [26], disponible gratuitamente en Internet. Las cavidades son los sitios de unión favoritos de las moléculas pequeñas, debido a que al albergarse en ellas se maximizan los contactos que confiere afinidad al complejo. Las cavidades se pueden predecir por diferentes métodos [27], uno de ellos es el servidor CASTp (figura 13) [28]. Estos sitios deben poseer un tamaño suficiente para albergar la molécula del ligando, así como un balance entre regiones no polares que contribuyen a un anclaje por efecto hidrofóbico, y grupos polares que forman puentes de hidrógeno y que comúnmente son la base de la selectividad por el ligando (figura 11a). Debe considerarse que no es posible predecir si la ocupación de un sitio en la superficie causará un efecto de inhibición en la actividad biológica, salvo si se trata del sitio activo de la enzima. Sin embargo los sitios activos son generalmente muy conservados y si se desea diseñar un inhibidor contra la enzima de un parásito, y esta enzima está presente también en el hospedero, será difícil lograr especificidad por la proteína del patógeno. Otra desventaja de diseños contra el sitio activo es que la inhibición de una enzima dentro del metabolismo genera acumulación de sustrato sin procesar, que al aumentar de concentración compite con el inhibidor por el sitio activo.

En lo que respecta al ligando, para poder evaluar su interacción con el receptor es necesario antes asignarle cargas parciales [29, 30]; y para considerar su flexibilidad hay diferentes alternativas [31]. Una de ellas es calcular los confórmeros del ligando (figura 14) y minimizar la energía de cada uno para encontrar las conformaciones óptimas. Todas aquellas con energía superior a un cierto umbral —por ejemplo, 3 o 4 kcal/mol— respecto a la más

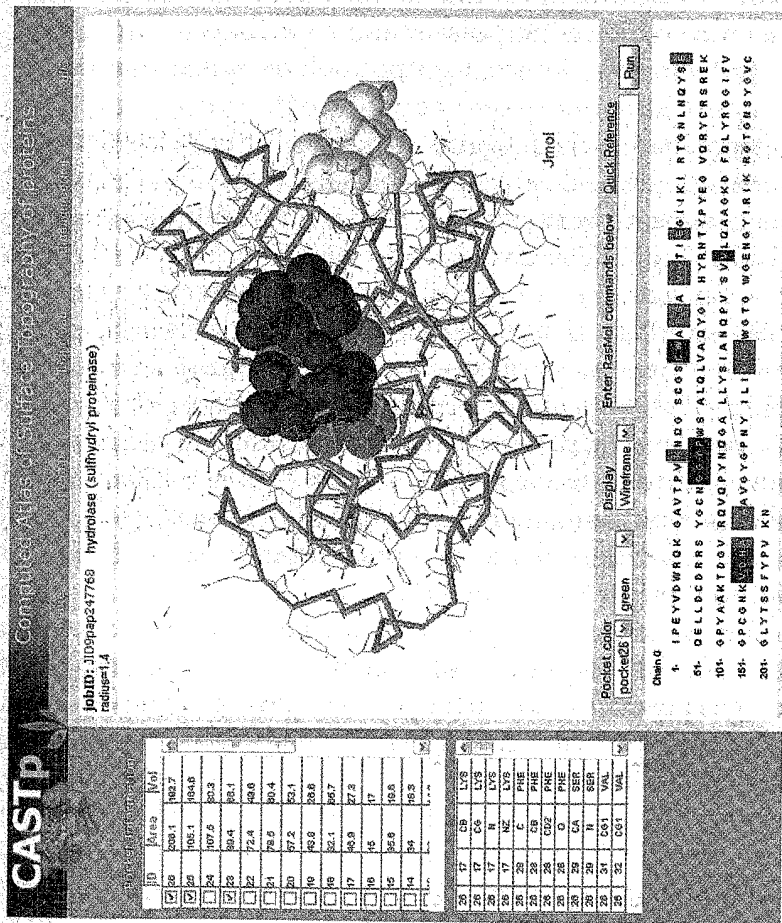


Figura 13. Identificación de cavidades con CASTP. La pantalla de resultados es interactiva; a la izquierda puede seleccionarse la cavidad que se desea estudiar. Además se detallan las características geométricas de los sitios encontrados, ordenados por volumen. Al ser seleccionada alguna cavidad, ésta se representa en la estructura al encender los átomos que lo integran e identificarlos por colores con su equivalente en la secuencia. El recuadro situado abajo a la izquierda es la lista de los átomos que conforman las paredes de la cavidad. En esta figura se representan las cavidades más grandes (verde y azul) en la estructura de la papaína (PDB: 9PAP), que forman el sitio activo. También se destaca en color amarillo un sitio adicional, más pequeño.

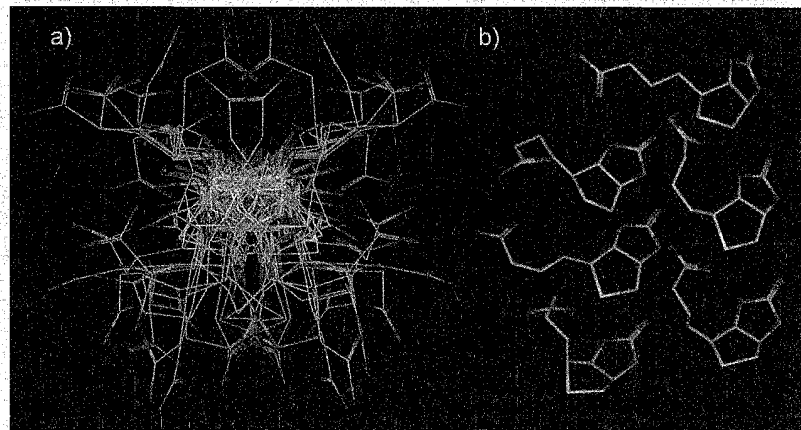


Figura 14. Algunos conformeros de un ligando pequeño, la biotina. a) traslape de 56 estructuras en conformaciones correspondientes a mínimos de energía. Cada una de ellas tiene energías inferiores a 3 kcal/mol respecto a la más estable, calculadas con un potencial para moléculas orgánicas [11,12]. b) Algunas de las conformaciones mostradas en el traslape de la izquierda para mostrar las diferencias estructurales. En ella se puede apreciar que los conformeros tienen átomos idénticos enlazados en el mismo orden, pero han sufrido rotación alrededor de sus enlaces.

Por otra parte, la molécula pequeña debe ensayarse en varios miles de orientaciones y posiciones posibles dentro del sitio, y es necesario seleccionar a las mejores, por lo que un criterio de evaluación numérico es nuevamente requerido. Éste puede ser puramente geométrico; puede estimar los contactos vdW, electrostáticos y por puente de hidrógeno entre el receptor y el ligando; considerar la energía propia de la conformación de la molécula pequeña; incluir términos de solvatación o de interacción con el solvente; o generar un esquema de puntaje que sea una combinación de alguno de esos factores [29, 31].

El material discutido en esta sección puede integrarse en un esquema como el de la figura 15. Se han mencionado diferentes bases de datos que proveen los

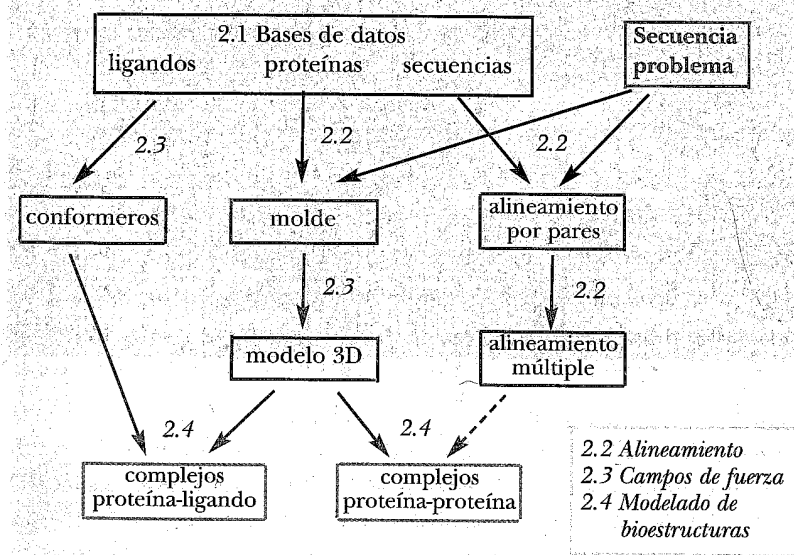


Figura 15. Esquema del material presentado hasta el momento. Los números representan la sección donde se discutió el procedimiento que da origen a un producto bioinformático. Los procedimientos se representan por flechas, los productos se encuentran en cajas con bordes redondeados. El material de partida en cajas con esquinas rectas.

insumos o materia prima para el trabajo bioinformático, al igual que la información nueva, por ejemplo una secuencia recién determinada y aún no publicada. Aunque en el esquema no se muestra por razones de simplicidad, otra fuente de información inicial puede ser una nueva estructura tridimensional experimental. La siguiente etapa implica alguno de los procedimientos descritos en las secciones 2.2, 2.3 y 2.4; es decir, la construcción de alineamientos de secuencias, la optimización de geometría por búsqueda de mínimos de energía y la producción de modelos tridimensionales de diferentes tipos, respectivamente. La intención de este esquema es destacar algunas características generales relacionadas con las herramientas bioinformáticas. Una de ellas es que no se utilizan aisladas, sino que frecuentemente el resultado de una es el punto de partida de otra; más aún, los resultados de la segunda herramienta pueden retroalimentar a la primera para ajustar parámetros y recalcular. Esto implicaría adicionar al esquema de la figura 15 algunas flechas que indiquen un flujo hacia arriba. Por otra parte, aunque las restricciones que impone el formato escrito de un libro obliga a describirlas una después de la otra, en realidad no se aplican de manera lineal sino que en realidad forman un entramado. Otra característica es que un mismo procedimiento puede tener diferentes objetivos, por ejemplo el alinear secuencias puede servir tanto para buscar a todos los miembros de una familia de proteínas, para encontrar secuencias parecidas con estructura conocida, para comparar dos secuencias o para buscar moldes por hilvanado. De manera similar, un campo de fuerza puede utilizarse para simular la flexibilidad de ligandos antes de construir complejos, para ajustar las cadenas laterales nuevas durante el modelado de una proteína, o para seleccionar las mejores orienta-

ciones al modelar un complejo. Esta flexibilidad de los procedimientos bioinformáticos es una de las razones para llamarles herramientas. En la siguiente sección se describirán algunas consideraciones adicionales y aplicaciones de las metodologías de la figura 15.

### 3. ALGUNAS APLICACIONES

#### 3.1. Más sobre alineamientos

Un procedimiento que vale la pena resaltar en la búsqueda de secuencias es la iteración. Imaginemos que la búsqueda de proteínas similares a la secuencia de una proteína nos arroja un total de 20 resultados positivos. Cada una de estas 20 secuencias puede enviarse a su vez a buscar a sus homólogos en un segundo ciclo de exploración de la base de datos. Esto podría permitir encontrar otras cinco proteínas que, aunque lejanas a la secuencia original (suponiendo que no hubieran sido encontradas en el primer ciclo) pertenecen al mismo grupo. El utilizar estas cinco en un tercer ciclo de búsqueda podría detectar nuevas y el proceso continúa hasta lograr consistencia, es decir, que ya no puedan identificarse secuencias adicionales. Este procedimiento no sólo permite construir conjuntos completos de los miembros de una familia, sino que también se convierte en una forma de aumentar las posibilidades de identificar moldes para modelado por homología (figura 9). Si una secuencia no tiene similitud clara con ninguna de las que tienen estructura tridimensional, pero existe una tercera proteína que sea simultáneamente similar a la problema y a la cristalizada, faculta a esta última a servir de molde. Incluso, puede decirse que la existencia de al menos una

secuencia con estructura tridimensional permite el modelado de todos los miembros de la familia. Por esta razón es tan importante el encontrar nuevos patrones de plegamiento, y es desafortunado que no aparezcan recientemente (figura 8).

También, recordemos que en un alineamiento cada posición se interpreta como aminoácidos equivalentes; esto es, que se encuentran en un sitio similar de la estructura y que realizan acciones semejantes, ya sea estructurales o biofuncionales. Sin embargo, en el alineamiento existe la posibilidad de tener identidades o similitudes obtenidas por azar. Pensemos simplemente que en todas las proteínas existen los mismos veinte aminoácidos, algunos de ellos con gran frecuencia, y si se alinean dos secuencias no relacionadas siempre aparecerán unas cuantas identidades, que no implican ninguna inferencia estructural o funcional. Aun cuando el valor de expectación sea alto, se esperan coincidencias fortuitas. Una forma de mejorar la precisión de un alineamiento, es realizarlo múltiple entre los miembros de la familia. Así, podemos decir que la cantidad de información contenida aumenta de arriba hacia abajo en la siguiente lista:

- Alineamiento de un par de secuencias.
- Alineamiento múltiple.
- Estructura tridimensional.
- Juego de estructuras similares traslapadas.

El alineamiento múltiple permite ver si existen posiciones conservadas en toda la familia, y por ende esenciales por alguna razón funcional, así como distinguir las de las identidades fortuitas en un par de las secuencias. Aprovechando aún más el alineamiento múltiple, puede dividirse en dos grupos. El de las secuencias más divergentes entre sí en la familia y el de las más parecidas a la

secuencia en estudio. En el primero, las posiciones conservadas son muy significativas y consideradas indispensables en la familia, pues se mantienen a pesar de la divergencia o de la distancia evolutiva. En el segundo, las posiciones no conservadas muestran las regiones de menor restricción estructural, con menos contactos o sin una funcionalidad que deba ser conservada. Además, el alineamiento múltiple muestra las regiones que permiten el recorte o la inclusión de segmentos a la estructura, a través de la localización de las inserciones.

### 3.2. Información tridimensional

A pesar de la cantidad de información que se encuentra contenida en un alineamiento múltiple, la construcción de éste en general está basada en una matriz de comparación y los valores seleccionados de penalización. Sin embargo, la existencia de la estructura tridimensional de al menos una de las secuencias del conjunto, provee información de las zonas expuestas al solvente y de las regiones que no permiten cambios de longitud de la cadena, lo cual permite ajustar el alineamiento, por ejemplo para casos como el de la figura 4d. Una riqueza aún mayor es contar con las estructuras de diferentes miembros de la familia. Éstas se pueden traslapar (figura 16a) con ayuda de programas como Dali [32], y observar cuáles son las posiciones realmente equivalentes en la familia, siendo posible construir así un alineamiento basado en el traslape estructural, o topológico, que es de mucho mayor precisión que el generado por matrices de comparación. También puede apreciarse cómo ha resuelto la naturaleza problemas en esa familia estructural relacionados con los cambios en longitud de la cadena (figuras 16a y b).

Además, aunque a primera impresión se perciba una alta conservación estructural, existen regiones que no tienen equivalente entre sí, como se muestra en el panel d) de la figura 16.

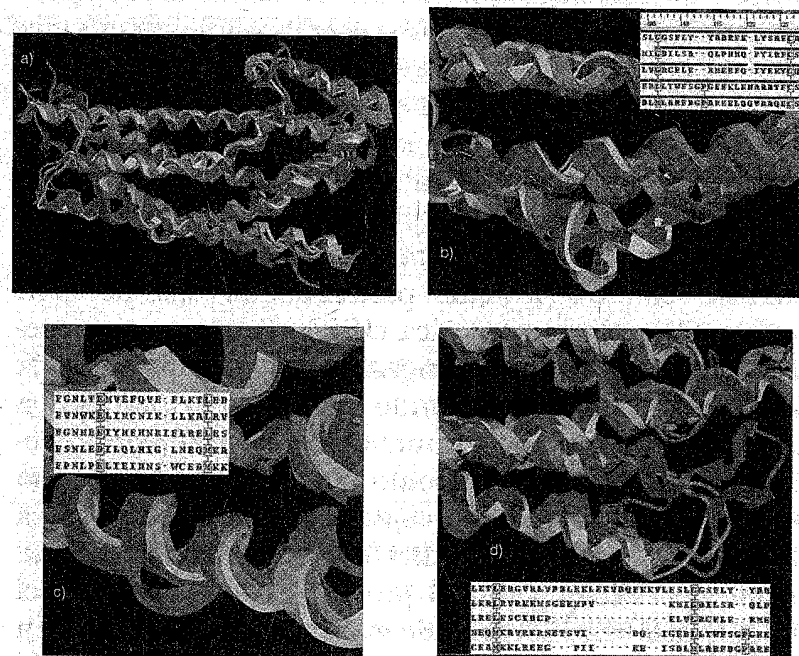


Figura 16. Traslape de la representación de la cadena principal de cinco estructuras del factor de intercambio de guanina de distintas especies (PDB: 1FOE, 1KI1, 1LB1, 1X86 y 1XCG). a) A pesar de que en esta familia las secuencias tienen identidades menores al 25%, el patrón general de la estructura se conserva, con desviaciones promedio de 2.3 Å. b) El traslape permite identificar zonas de la estructura capaces de incorporar un aumento en el número de aminoácidos. Se muestra en el recuadro el alineamiento de la hélice en la parte inferior de la figura. Los aminoácidos enmarcados en morado son residuos topológicamente equivalentes. c) Otra región que permite la inserción de una isoleucina (I) en la medianía de una hélice. d) A la derecha se observa en la cadena roja, una gran inserción en una parte de la estructura con gran variabilidad. Nótese que en esta región todas las secuencias mostradas divergen, siendo la morada mucho más corta que las demás y no teniendo realmente aminoácidos equivalentes a las otras en esta porción.



### 3.3. Movilidad molecular

Contrario a la impresión que pudieran causar las imágenes de estructuras de proteínas, éstas son fluctuantes y poseen movimientos que incluso en ocasiones son funcionales. Una forma de simular este movimiento es a través de la dinámica molecular. Con la derivada de la energía con respecto a la posición puede calcularse la fuerza que resiente cada uno de los átomos en el sistema, y como vimos antes, que se utiliza en las optimizaciones de geometría. En principio, la fuerza puede utilizarse también para describir el movimiento de cada componente atómico en una proteína partiendo de una posición dada, utilizando la mecánica clásica. Esto es, si conocemos las coordenadas y asignamos velocidades a cada átomo al azar, pero guardando una distribución que sea compatible con la temperatura deseada, podemos predecir la posición de esos átomos un instante de tiempo después. Además, podemos ajustar las velocidades a cada instante, pues de la fuerza dividida por la masa del átomo tenemos la aceleración. El proceso es iterativo, y en el modelo más sencillo, en cada etapa de cálculo se asumen velocidades, fuerzas y aceleraciones constantes. Para que esta suposición sea válida deben tomarse intervalos muy pequeños de tiempo en cada iteración, típicamente uno o dos femtosegundos ( $1 \text{ fs} = 1 \times 10^{-12} \text{ s}$ , o una billonésima de segundo). Con la acumulación de iteraciones se puede simular el movimiento hasta el orden de décimas de milisegundo con la tecnología de cómputo actual. La aplicación de la dinámica molecular no se restringe a describir el movimiento de una estructura conocida, sino también a mover las conformaciones en mínimos de energía para encontrar otros nuevos, durante el modelado de ligandos, proteínas o complejos. También permite

comparar los efectos de mutaciones o de modificaciones químicas en las estructuras y un sinnúmero de otras aplicaciones. Una gran desventaja de la dinámica molecular radica en su costo computacional. Recientemente se ha propuesto una alternativa para visualizar las complejas vibraciones estructurales, prediciéndolas como la suma de movimientos armónicos (regulares) que pueden describirse de forma colectiva [33]. Justamente estos movimientos colectivos son difíciles de predecir por dinámica molecular pues ocurren en escalas de tiempo mayores de un milisegundo, aún intratables con la tecnología computacional actual y los algoritmos comunes.

### 3.4. Interacciones intermoleculares

El método de *docking* para moléculas pequeñas, puede utilizarse para predecir la forma en que se une una molécula que ya ha demostrado experimentalmente poderse unir a un receptor; es decir, modelar el complejo entre ellos. Con ese modelo se puede inferir el tipo de interacciones y de grupos químicos que son el anclaje principal del ligando, y sugerir experimentos para verificarlo. También se usa para ensayar un pequeño número de ligandos y tratar de proponer los grupos o propiedades estructurales que son las responsables de una diferencia en su actividad o selectividad. Por ejemplo, en la figura 17 se muestra el modelo del sitio activo de una enzima [34] y la correlación encontrada para la selectividad que tiene ésta frente a diferentes sustratos.

Durante el trabajo bioinformático generalmente se desconocen muchos detalles sobre la estructura del sujeto de estudio. El realizar de manera simultánea experimentos relacionados, abre la posibilidad de una colaboración estrecha

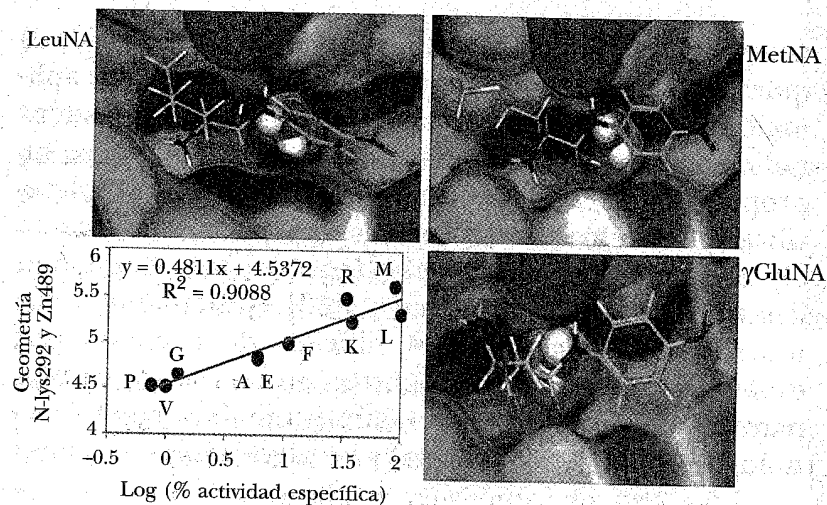


Figura 17. Modelado del sitio activo de la aminopeptidasa y de su asociación con diferentes sustratos. El código de color en la superficie es idéntico al de la figura 11. Cada uno de los sustratos está formado por un aminoácido y un grupo químico (NA) que permite ser detectado cuando es transformado por la enzima, y difieren entre sí en la naturaleza del aminoácido. La gráfica inserta muestra la correlación entre un parámetro geométrico del complejo y la selectividad o preferencia de la enzima por los diferentes sustratos ensayados.

entre los estudios computacionales y los ensayos bioquímicos. En la figura 18 se muestra un modelo fruto de la retroalimentación entre experimentación y bioinformática. Se trata de un dímero de dominios estructurales denominados END, por ser los finales de una serie de ellos en la cadena. Se sabe que éstos se anclan en el interior de la membrana de microorganismos para empujarla o jalarla. En este caso, se ha demostrado que el dominio END de amiba, es capaz de unir con gran afinidad y especificidad un tipo especial de lípido de membrana, llamado sulfátido. Sobre el modelo del dímero construido por homología a una estructura semejante proveniente de un hongo, y con retroalimentación de estudios

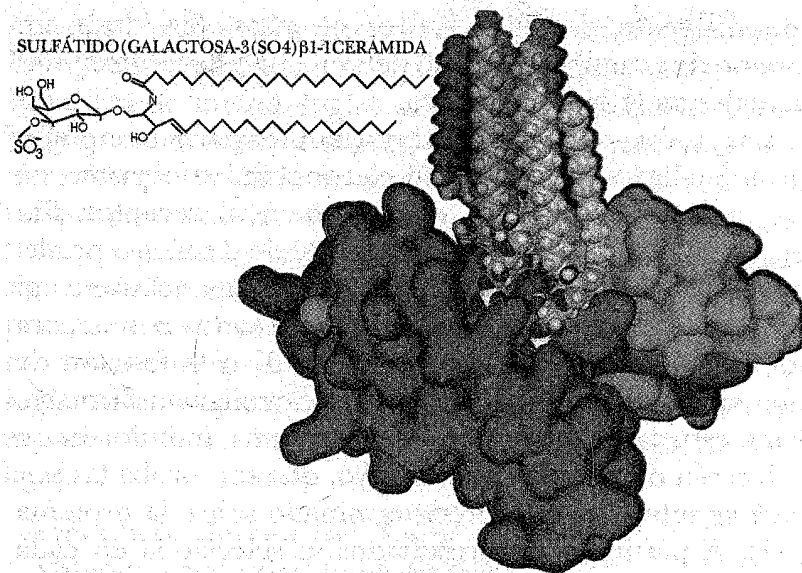


Figura 18. Modelo del dímero de dominios END. En verde y magenta se destacan las dos cadenas que lo constituyen. En la parte superior se proponen las cuatro moléculas del sulfátido unidas y orientadas. Se sugiere que las cadenas hidrocarbonadas del lípido (representadas en tonos de café) estarían insertas en la membrana. Adaptado de la referencia [35].

experimentales, se predijo por *docking* la presencia de dos sitios potenciales de interacción con el sulfátido, se construyó el modelo tridimensional del complejo multimolecular y se propuso una hipótesis de la necesidad de reclutamiento de esos lípidos para lograr el anclaje en la membrana [35].

Una aplicación diferente del *docking* es la predicción de las interacciones que una proteína puede tener con las demás presentes en el medio. Si esto se extiende a escala de organismos completos, tendríamos el llamado interactoma o mapa de reconocimiento entre las proteínas de una especie determinada. Cercanamente relacionado estaría la predicción de la función de cada proteína y la

identificación de sitios activos en ellas. Sin duda un campo de gran interés y que delimita una de las fronteras actuales de la bioinformática.

Los casos descritos anteriormente para complejos proteína-ligando, involucran el conocimiento previo de las moléculas pequeñas que se unen al receptor. Sin embargo, existe la enorme necesidad de diseñar o predecir qué molécula tendrá la capacidad de anclarse a un sitio particular, para ser utilizada como sonda o bien para inhibir la asociación de proteínas [36] o la función de una enzima con el propósito de desarrollar un fármaco. Para esta tarea se puede partir de una quimioteca, o colección de moléculas de ensayo, que son probadas por *docking* sobre un sitio predeterminado sobre la proteína [37]. A partir de esos resultados se selecciona en cada compuesto la mejor orientación para el acoplamiento y posteriormente se ensayan experimentalmente los mejores candidatos. Los que demuestren poseer afinidad, pueden a su vez convertirse en compuestos líderes que por modificación química o computacional produzcan nuevas moléculas con mayor actividad potencial. Una alternativa para detectar inhibidores de alta afinidad, es realizar el *docking* con fragmentos comunes de moléculas, pequeños conjuntos de grupos funcionales. Cuando el sitio de unión en el receptor es tapizado de algunos de estos grupos, se busca en las quimiotecas compuestos que posean esos conjuntos a una distancia similar, o bien diseñar una ruta de síntesis de nuevas sustancias con base en los requerimientos de grupos químicos y posición relativa.

### 3.5. Otras moléculas y tareas

Este capítulo ha estado centrado esencialmente a proteínas, debido al sesgo del autor. Pero esto no significa

que sean los únicos sujetos de interés en bioinformática. Por ejemplo, en el caso de los ácidos nucleicos, existe una infinidad de metodologías para predecir sitios de regulación y control de la expresión, así como para predecir estructura secundaria en una secuencia; es decir, la forma en que partes de la cadena de nucleótidos se pliegan para formar segmentos unidos por puentes de hidrógeno consigo misma y que estabilicen la doble hélice. También pueden predecirse los sitios de corte de enzimas específicas y secuencias cebadoras (*primers*) para tareas de biología molecular, análisis de genomas, y un sinnúmero de otros análisis. Al lector interesado se le refiere a las siguientes ligas:

- [www.ncbi.nlm.nih.gov/Tools](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Tools)
- [hum-molgen.org/bioinformatics](http://hum-molgen.org/bioinformatics)
- [sites.univ-provence.fr/~wabim/english/logligne.html](http://sites.univ-provence.fr/~wabim/english/logligne.html)
- [www.biochemweb.org/genes.shtml](http://www.biochemweb.org/genes.shtml)
- [bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/)

En el caso de carbohidratos, existe un número cada vez mayor de herramientas disponibles, visitar por ejemplo:

- [www.biochemweb.org/carbohydrates.shtml](http://www.biochemweb.org/carbohydrates.shtml)
- [www.glycosciences.de](http://www.glycosciences.de)

Estos sitios permiten el acceso a bases de datos relacionados con azúcares y a tareas de edición molecular, por ejemplo construir oligosacáridos [38], unirlos a cadenas polipeptídicas para modelar glicoproteínas, modificar los ángulos de enlace glicosídico o analizar éstos de manera comparativa con los observados en las estructuras experimentales.

Por otra parte, como el lector puede imaginar, existen varios métodos no mencionados, uno de ellos es la construcción de relaciones evolutivas o árboles filogenéticos.

En ellos, cada uno de los objetos por clasificar, por ejemplo secuencias, se colocan en la punta de la rama de un árbol, la distancia a través de las ramas es proporcional a la diferencia entre ellas. Así, los objetos muy semejantes están en hojas de la misma rama, mientras que los muy alejados se encuentran en ramas que se separan del tronco casi desde su base.

#### 4. CONSIDERACIONES FINALES

La bioinformática es una disciplina que se desarrolla con una gran velocidad, vinculada a los adelantos tecnológicos tanto experimentales como computacionales. Podemos generalizar que esta disciplina está basada en una gama de modelos que representan sistemas biológicos, frecuentemente parametrizados en función a datos experimentales. Tiene como propósito explicar y predecir observaciones experimentales. Entre sus limitaciones se encuentra la gran variedad de casos especiales que se presentan en los sistemas relacionados con la vida; se dice incluso, un tanto a nivel de broma, que *la única regla en biología es que no hay reglas*; aun así, cada uno de los modelos que han demostrado éxito predictivo ha logrado extraer la esencia de la relación entre causa y efecto, al menos para el conjunto de casos ensayados. Otra limitación es la gran capacidad combinatoria de los sistemas, que con mucha frecuencia evita que, a pesar del extraordinario poder de cómputo que tenemos ahora a nuestro alcance, se puedan ensayar y estudiar de forma sistemática todas las opciones posibles en un determinado proyecto bioinformático. Por ejemplo, es prohibitivo ensayar todos los alineamientos posibles entre una secuencia y cada una de aquellas que conforman una gran

base de datos, por lo que se tiene que recurrir a algoritmos simplificados. Tampoco se pueden generar todas las secuencias posibles de cadenas de una longitud razonable (alrededor de 300 aminoácidos) para determinar cuáles de ellas podrían tener propiedades biológicas; ni, para una sola de ellas, enumerar y evaluar todas sus conformaciones en el espacio. En el caso del *docking*, el número de orientaciones relativas entre dos moléculas es enorme, la flexibilidad de ligandos pequeños obliga a reducir las conformaciones ensayadas a unas pocas, y es prácticamente imposible estudiar siquiera una fracción pequeña pero significativa de los posibles cambios de conformación del receptor inducidos por la aproximación del ligando. Sin afán de hacer la lista extensiva, cabe señalar que contra la enorme magnitud de posibilidades, los modelos en bioinformática utilizan el muestreo al azar de ellas, un muestreo sesgado; o bien la inclusión de criterios heurísticos.

Por los motivos anteriores, es conveniente tener precauciones en el uso de las herramientas bioinformáticas. Una precaución obvia es leer la documentación del programa o servidor, en particular para conocer las limitaciones del modelo, el alcance y diversidad de las moléculas o casos de prueba que se utilizaron para derivar el método, y el alcance de las modificaciones a parámetros que el usuario puede hacer. Adicionalmente, es interesante hacer un seguimiento a la literatura publicada donde investigadores, diferentes a los autores de la herramienta, analicen y discutan los resultados obtenidos con ella. Entre más éxito tiene una metodología, más trabajo y referencias a ella se publican, aunque con una cierta tendencia hacia los métodos gratuitos, por su accesibilidad para todos. Aunque no siempre es posible, una forma adicional de verificar la precisión de una meto-

dología es utilizarla uno mismo sobre un sistema (de preferencia dos o más) en el que ya se conoce la solución, y que sea lo más cercano posible al problema por resolver; y sobre esos casos de trabajo explorar los límites de los parámetros del método. Por ejemplo, modelar la estructura o complejo de un sistema que ya haya sido determinado experimentalmente, sin utilizar esa última información, por supuesto. Este tipo de validación tiene la ventaja de que permite aprender más detalles de la técnica.

Al igual que otros métodos, como la espectroscopía, cromatografía, biología molecular, etcétera, la bioinformática no es tan útil si no se le combina con otras disciplinas. Siempre se logrará potenciar al nutrirse de información experimental, y además retroalimentará al diseño de experimentos. La información del sistema en estudio y de los resultados experimentales realizados sobre éste, siempre permitirán tomar mejores decisiones durante el uso de las herramientas bioinformáticas.

Para profundizar en el tema hay un número creciente de textos que pueden clasificarse en tres grupos: i) los dirigidos de manera muy práctica a utilizar las herramientas [39-43] sin tanto énfasis en la descripción de la metodología; ii) aquellos que están más interesados en explicar las características de los métodos, que en el uso directo de las herramientas [16, 44-47] y, finalmente; iii) los que están dirigidos a programadores y desarrolladores de algoritmos [48-51]. Algunas veces, las diferencias no son claras del título del libro y, muchas otras, ni siquiera de la consulta del índice, por lo que resulta útil revisar el contenido antes de seleccionarlo. Para una descripción de las fronteras del campo de la bioinformática de proteínas se recomienda la lectura de la referencia [52] y para una visión general y muy didáctica, las referencias [53 y 54].

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, convenio 105532 y ECOS M05-S01.

## REFERENCIAS

1. N. M. Luscombe, D. Greenbaum, M. Gerstein, What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field, *Methods of Information in Medicine*, **40**, 346-358 (2001).
2. D. A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, E. W. Sayers, *GenBank. Nucleic acids research* **38**, D46-D51 (2010), ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)).
3. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242 (2000) ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)).
4. F. H. Allen, The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, *Acta Crystallographica* **B58**, 380-388 (2002). ([www.ccdc.cam.ac.uk](http://www.ccdc.cam.ac.uk)).
5. M. Clamp, J. Cuff, S. M. Searle, G. J. Barton, G. J. The Jalview Java Alignment Editor, *Bioinformatics*, **20**, 426-427 (2004), ([www.jalview.org](http://www.jalview.org)).
6. M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, D. G. Higgins, Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948 (2007), ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)).
7. M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis, T. L. Madden. NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Research* **36**, W5-W9 (2008), ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).
8. A. D. MacKerell Jr., M. Feig, C. L. Brooks, III, Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations, *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1400-1415 (2004).

9. A. D. MacKerell, Jr., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr., J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, III, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, M. Karplus; All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins, *Journal of Physical Chemistry B* **102**, 3586-3616 (1998).
10. J. Fabricius, S. B. Engelsen, K. Rasmussen, The PEF95SAC Carbohydrate Force Field, *Journal of Carbohydrate Chemistry* **16**, 751-772 (1997).
11. T. A. Halgren, MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies, *Journal of Computational Chemistry* **20**, 720-729 (1999).
12. T. A. Halgren, MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries, *Journal of Computational Chemistry* **20**, 730-748 (1999).
13. C. A. Wilson, J. Kreychman, M. Gerstein. Assessing annotation transfer for genomics: quantifying the relations between protein sequence, structure and function through traditional and probabilistic scores, *Journal of Molecular Biology* **297**, 233-249 (2000).
14. A. A. Canutescu, A. A. Shelenkov, R. L. Dunbrack Jr., A graph theory algorithm for protein side-chain prediction, *Protein Science* **12**, 2001-2014 (2003), ([dunbrack.fccc.edu/SCWRL3.php](http://dunbrack.fccc.edu/SCWRL3.php)).
15. J. Singh, J. M. Thornton, *Atlas of protein side-chain interactions*, Oxford University Press, EUA (1992).
16. C. A. Orengo, D. T. Jones, J. M. Thornton. Bioinformatics. *Genes, proteins & computers*, Garland/BIOS Sci. Pub., Nueva York (2003).
17. S. J. de Vries, A. M. J. J. Bonvin, How Proteins Get in Touch: Interface Prediction in the Study of Biomolecular Complexes, *Current Protein & Peptide Science* **9**, 394-406 (2008).
18. S. Jones, J. M. Thornton, Prediction of protein-protein interaction sites using patch analysis, *Journal of Molecular Biology* **272**, 133-143 (1997).
19. Y. Murakami, S. Jones, SHARP2; Protein-Protein Predictions using Patch Analysis, *Bioinformatics* **22**, 1794-1795 (2006), ([www.bioinformatics.sussex.ac.uk/SHARP2](http://www.bioinformatics.sussex.ac.uk/SHARP2)).
20. I. A. Vakser, P. Kundrotas, Predicting 3D structures of protein-protein complexes, *Current Pharmaceutical Biotechnology* **9**, 57-66 (2008).
21. D. W. Ritchie, Recent progress and future directions in protein-protein docking, *Current Protein and Peptide Science* **9**, 1-15 (2008).
22. J. J. Gray, High-resolution protein-protein docking, *Current Opinion in Structural Biology* **16**, 183-193 (2006).
23. A. M. Bonvin, Flexible protein-protein docking, *Current Opinion in Structural Biology* **16**, 194-200 (2006).
24. A. R. Leach, B. K. Shoichet, C. E. Peishoff, Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps, *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 5851-5855 (2006).
25. B. O. Villoutreix, N. Renault, D. Lagorce, O. Sperandio, M. Montes, M. A. Miteva, Free resources to assist structure-based virtual ligand screening experiments, *Current Protein and Peptide Science* **8**, 381-411 (2007).
26. A. J. Padilla-Zúñiga, A. Rojo-Domínguez, Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking. Aplicación al diseño de fármacos, *Mensaje Bioquímico* **26**, 129-145 (2002). (<http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/MensajeBioquímico/HomePage>).
27. A. T. Laurie, R. M. Jackson. Methods for the prediction of protein-ligand binding sites for structure-based drug design and virtual ligand screening, *Current Protein and Peptide Science* **7**, 395-406 (2006).
28. J. Dundas, Z. Ouyang, J. Tseng, A. Binkowski, Y. Turpaz, J. Liang, CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues, *Nucleic Acids Research* **34**, W116-W118 (2006), ([sts-fw.bioengr.uic.edu/castp](http://sts-fw.bioengr.uic.edu/castp)).
29. G. L. Warren, C. W. Andrews, A. M. Capelli, B. Clarke, J. LaLonde, M. H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S. F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I. D. Wall, J. M. Woolven, C. E. Peishoff, M. S. Head. A critical assessment of docking programs and scoring functions, *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 5912-5931 (2006).
30. J. Kirchmair, P. Markt, S. Distinto, G. Wolber, T. Langer, Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—what can we learn from earlier mistakes?, *Journal of Computer Aided Molecular Design* **22**, 213-228 (2008).
31. S. F. Sousa, P. A. Fernandes, M. J. Ramos. Protein-ligand docking: current status and future challenges, *Proteins* **65**, 15-26 (2006).

32. L. Holm, S. Kaariainen, P. Rosenstrom, A. Schenkel, Searching protein structure databases with DaliLite v.3., *Bioinformatics* **24**, 2780-2781 (2008), (ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali\_server).
33. K. Suhre, Y. H. Sanejouand, ElNemo: a normal mode web-server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement, *Nucleic Acids Research* **32**, W610-W614 (2004), (www.igs.cnrs-mrs.fr/elNemo).
34. I. Herrera-Camacho, N. H. Rosas-Murrieta, A. Rojo-Domínguez, L. Millán, J. Reyes-Leyva, G. Santos-López, P. Suárez-Rendueles, Biochemical characterization and structural prediction of a novel cytosolic leucyl aminopeptidase of the M17 family from *Schizosaccharomyces pombe*, *FEBS Journal* **274**, 6228-6240 (2007).
35. J. D. Díaz-Valencia, M. J. Almaráz-Barrera, L. E. Arias-Romero, R. Hernández-Rivas, A. Rojo-Domínguez, N. Guillén, M. Vargas, The ABP-120 C-end region from *E. histolytica* interacts with sulfatide, a new lipid target, *Biochemical and biophysical research communications* **338**, 1527-1536 (2005).
36. S. Zhong, A. T. Macias, A. D. MacKerell, Jr., Computational identification of inhibitors of protein-protein interactions, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **7**, 63-82 (2007).
37. M. J. Lipkin, A. P. Stevens, D. J. Livingstone, C. J. Harris. How Large Does a Compound Screening Collection Need To Be?, *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **11**, 482-493 (2008).
38. A. Bohne, E. Lang, C. W. von der Lieth, SWEET-WWW-based rapid 3D construction of oligo- and polysaccharides, *Bioinformatics* **15**, 767-768 (1999).
39. J. M. Claverie, C. Notredame, *Bioinformatics for dummies*, segunda edición, Wiley Publ., New Jersey (2007).
40. A. M. Lesk. *Introduction to bioinformatics*, segunda edición. Oxford University Press (2005).
41. P. H. Dear, *Bioinformatics*, *Methods Express*, Scion Pub., Inglaterra (2007).
42. S. Q. Ye, *Bioinformatics. A practical approach*, Chapman & Hall/CRC, Londres (2008).
43. P. M. Selzer, R. J. Marhöfer, A. Rohwer, K., *Applied bioinformatics. An introduction*, Springer-Verlag, Heidelberg (2008).
44. A. Tramontano, *Introduction to Bioinformatics*, Chapman & Hall/CRC, Boca Ratón, Florida, EUA (2007).
45. J. Xiong, *Essential Bioinformatics*, Cambridge University Press, Nueva York (2006).
46. N. Gautham, *Bioinformatics. Databases and algorithms*, Alpha Science, Oxford, Inglaterra (2007).
47. S. Ignacimuthu, *Basic Bioinformatics*, Alpha Science International. Harrow, Inglaterra (2005).
48. S. Aluru, editor, *Handbook of computational molecular biology*, Chapman & Hall /CRC, Boca Ratón, Florida, EUA (2006).
49. A. Kukol, *Molecular modeling of proteins*, Humana Press, Nueva Jersey, EUA (2008).
50. J. J. Ramsden. *Bioinformatics: An introduction*, Kluwer Academic Publishers, Holanda (2004).
51. I. Eidhammer, I. Jonassen, W. R. Taylor, *Protein bioinformatics. An algorithmic approach to sequence and structure analysis*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, Inglaterra (2004).
52. A. Tramontano, *The ten most wanted solutions in protein bioinformatics*, Chapman & Hall/CRC. Boca Ratón, Fl., EUA (2005).
53. M. Zvelebil, J. O. Baum, *Understanding bioinformatics*, Garland Science, Nueva York, EUA (2008).
54. D. W. Mount, *Bioinformatics, sequence and genome analysis*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2004).

**AÑO DE LOS CENTENARIOS**

**1810**

**1910**

Este libro se terminó de imprimir y encuadernar el 30 de noviembre de 2010 en los talleres de Editorial Cromocolor, S. A. de C. V., Miravalle 703 Col. Portales, C. P. 03300, México, D. F. La edición consta de 1000 ejemplares. La composición estuvo a cargo de Aline y Cristina Ortiz-Herrera.

**Editor: Carlos Francisco Zúñiga**