

página 1  
blanca

Dr. Juan Ramón de la Fuente  
*Rector*

Lic. Enrique del Val Blanco  
*Secretario General*

Mtro. Daniel Barrera Pérez  
*Secretario Administrativo*

Dra. Arcelia Quintana Adriano  
*Abogada General*

Dr. René Drucker Colín  
*Coordinador de la Investigación Científica*

Universidad Nacional Autónoma de México

Forjadores de la ciencia en la UNAM

Armando Gómez Puyou

Instituto de Fisiología Celular

Dr. René Drucker Colín  
*Coordinador de la Investigación Científica*

Ing. Jorge Gil Mendieta  
*Secretario Académico*

Dr. Raúl Herrera Becerra  
*Secretario de Investigación y Desarrollo*

Lic. Marcela Mendoza Figueroa  
*Secretaria Jurídica*

Sra. Alicia Mondragón Hurtado  
*Secretaria Administrativa*

Coordinación de la Investigación Científica

Forjadores de la ciencia en la UNAM

Ciclo de conferencias «Mi vida en la ciencia»

Julio 15 de 2003

Armando Gómez Puyou

Instituto de Fisiología Celular

*Mi vida en la ciencia*

J. Adolfo García Sáinz

Instituto de Fisiología Celular

*Semblanza del doctor*

*Armando Gómez Puyou*

México, 2003



Coordinación de la Investigación Científica  
Universidad Nacional Autónoma de México

Eminentes investigadores del Subsistema de la Investigación Científica que el 25 de abril de 2003 recibieron de manos del Rector, doctor Juan Ramón de la Fuente, el reconocimiento «Forjadores de la ciencia en la UNAM» participan en el ciclo de conferencias «Mi vida en la ciencia», que tiene lugar en la Sala del Consejo Técnico de la Investigación Científica. Estos cuadernillos recogen las conferencias preparadas por estos investigadores y las semblanzas que sobre ellos han aportado otros científicos.

D.R. © 2003, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Coordinación de la Investigación Científica,  
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.  
<http://www.cic-ctic.unam.mx>

ISBN (colección): 970-32-0849-5  
ISBN (volumen): 970-32-0843-6

Impreso y hecho en México

## *Mi vida en la ciencia*

Armando Gómez Puyou  
Instituto de Fisiología Celular

La UNAM tuvo la gentileza de incluirme dentro de la lista de “Forjadores de la ciencia en la UNAM”. Mucho le agradezco a nuestra universidad esta distinción. Como parte de este reconocimiento, la UNAM me solicitó que narrara y escribiera algunas páginas sobre “Mi vida en la ciencia”. La tarea no es fácil, ya que, necesariamente, implica una recopilación y evaluación de las actividades que he realizado a través de casi cinco décadas; sin embargo, lo hago con gusto, haciendo énfasis en los logros y fracasos que han marcado el rumbo de mis actividades.

En esta narración creo que hay una pregunta inicial que debo contestar. ¿Por qué la mayor parte de mi vida la he pasado trabajando en problemas que se ubican dentro de la investigación bioquímica? En realidad, no tengo una contestación; simplemente narraré lo que sucedió. Hacia fines de la década de 1950, tuve la oportunidad de asomarme a los laboratorios del doctor José Laguna y del doctor Efraín Pardo. Los laboratorios me parecieron fascinantes y, por lo tanto, le mencioné a los doctores Laguna y Pardo que tenía interés en trabajar con ellos. Por razones que aún ignoro, me aceptaron y, casi inmediatamente, me pidieron que estudiará el efecto de ciertos esteroides en la gluconeogénesis del embrión de pollo. Mis conocimientos sobre los embriones, los esteroides y la gluconeogénesis eran lastimosos; sin embargo, las palabras del título del proyecto me parecieron atractivas y enigmáticas, así que empecé a inyectar huevos, a sacar embriones y a medir glucógeno.

Después del periodo de adaptación y aprendizaje de la disciplina de los laboratorios, empecé a tenerle confianza a los experimentos y

a los resultados, y llegó uno de los momentos más emotivos en los inicios de las actividades de cualquier investigador: encontrar que ciertas manipulaciones controladas del sistema experimental ocasionan un efecto cuantificable y reproducible. La observación sobre el glucógeno y los esteroides no fue revolucionaria; de hecho, el fenómeno ya se conocía, lo emocionante fue que yo podía hacer observaciones. Es claro, cuando menos para mí, que cuando se hace una observación surgen preguntas, se hacen más experimentos, se obtienen resultados, se originan más preguntas y empieza un camino sin fin. Esto es lo que he hecho todo el tiempo que he permanecido en la UNAM, pero creo que debo ser más explícito.

Pienso que la narración de las actividades de cualquier investigador en orden cronológico tiene la emoción de un directorio telefónico. Es cierto que la cronología de los eventos da una idea acerca de la evolución del conocimiento, pero no dice mucho sobre lo que motiva a un investigador a explorar de manera obsesiva determinado problema. Creo que la principal motivación es la curiosidad pero, para comprender el trabajo de un investigador en toda su magnitud, se debe tomar en cuenta que la ciencia es una actividad mundial en la que, en un momento dado, surge en varios o muchos investigadores la compulsión por resolver un problema. Esto hace que la ciencia sea una actividad competitiva, en la que los resultados, conclusiones o hipótesis de un investigador se someten al escrutinio de sus colegas en otras partes del mundo. Con frecuencia, hay diferencias fuertes y opuestas entre diversos investigadores. El que existan divergencias sobre la naturaleza de un problema quiere decir que el problema no se ha resuelto y que, por lo tanto, es necesario volver al laboratorio y examinar nuevas alternativas.

Creo, entonces, que las actividades de un investigador se deben evaluar dentro de este contexto. Por lo tanto, narraré mis actividades en cierto orden cronológico, pero trataré de hacer énfasis en las fuerzas que motivaron mi trabajo, y el de muchos otros investigadores en ese momento. Espero que, de esta forma, el lector adquiera una idea de los factores que impulsaron el trabajo de muchos investigadores, incluyéndome a mí.



En 1957 se conocían bastante bien las principales vías metabólicas y hacía más o menos tres años que Watson y Crick habían publicado un modelo muy satisfactorio de la estructura del ADN. También se sabía que dentro de las células existen distintos organelos, y que en cada uno de ellos se llevaba a cabo una función definida. Esto fue un descubrimiento que conmocionó al mundo científico, ya que implicaba que dentro de cada una de nuestras células existen compartimentos especializados en realizar determinado trabajo. Me voy a centrar en las mitocondrias, ya que durante muchos años traté de entenderlas. En 1957 ya se había demostrado que en las mitocondrias se lleva a cabo el consumo de oxígeno y que es en ellas donde se encuentran todas las enzimas del ciclo de Krebs de los ácidos tricarbónicos. También se sabía que en las mitocondrias se fabrica casi todo el ATP que la célula necesita para llevar a cabo todas sus funciones. Además, se estaba empezando a establecer que la respiración era el resultado de la transferencia de electrones a través de varios componentes, hasta que finalmente llegaban al oxígeno, y que en un siguiente paso se formaban moléculas de agua. Al conjunto de estos componentes o enzimas de este sistema se le llamó cadena respiratoria. También se había demostrado que la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria se acompañaba de síntesis de ATP, a partir de ADP y fosfato. A la síntesis de ATP impulsada por la respiración se le conoce como fosforilación oxidativa.

La fenomenología de la fosforilación oxidativa estaba descrita en forma más o menos precisa; sin embargo, había muchas preguntas que requerían una explicación. Por ejemplo, ¿cómo el transporte de electrones se acompaña de la síntesis de ATP? También, muchos investigadores deseaban conocer el papel de las membranas en la fisiología celular. ¿Las membranas eran simplemente una línea divisoria entre los distintos compartimentos de las células o también participaban activamente en el metabolismo celular? En pocas palabras, lo que se necesitaba establecer eran los mecanismos de la fosforilación

oxidativa y de casi todas las otras funciones celulares; es decir, la bioquímica estaba pasando de la descripción a los mecanismos.

En esa época ya trabajaba en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y continuaba estudiando los esteroides. En esos tiempos era costumbre ir a la biblioteca y revisar u hojear las pocas revistas que llegaban a la Facultad. A pesar de las deficiencias y de la diferencia de los años actuales, en esa época era posible revisar gran parte de la literatura y tener una idea aceptable de todo lo que estaba ocurriendo en el mundo científico. Un día, leí un artículo de un doctor Gallagher, de Australia, en el que describía que las mitocondrias de hígado de rata tenían la capacidad de cambiar de volumen, es decir, se podían hinchar y contraer. El que un organelo intracelular pudiera sufrir esos cambios estructurales, me intrigó. La revisión de ese artículo coincidió con la llegada de una centrífuga de alta velocidad a nuestro departamento. Eso fue de importancia, ya que con esa centrífuga se podían preparar mitocondrias. Además, el Departamento contaba con un respirómetro de Warburg, que se había conseguido, en calidad de préstamo, de un laboratorio farmacéutico. Las observaciones de Gallagher eran interesantes; se podían preparar mitocondrias, se tenía el aparato para medir consumo de oxígeno, había ratas y yo tenía esteroides. Entonces, ¿por qué no estudiar el efecto de los esteroides en las mitocondrias?

Aquí es necesaria una digresión. Es necesario señalar que la mayor parte de mi trabajo lo he hecho en colaboración con otros investigadores o estudiantes. En la década de los 60, la participación del doctor Antonio Peña y de la doctora Marieta Tuena fueron fundamentales. Ambos son investigadores eméritos de nuestra UNAM. En esos años, me casé con la doctora Tuena, una de las personas más críticas que he tenido el placer de conocer, y desde entonces me ha acompañado en todas mis actividades, con muy buen humor y mucho sentido común. ¿Qué más se le puede pedir a una esposa?

Contábamos con ocho esteroides diferentes. Estudiamos su efecto sobre las mitocondrias y encontramos que siete no ejercían ningún efecto; sin embargo, uno de ellos, la triamcinolona, afectaba a las mi-

tocondrias dramáticamente. Éste es un esteroide sintético fluorado cuya síntesis requería un paso oxidativo que realizaba un hongo. Dentro de los efectos que la triamcinolona ejercía en las mitocondrias estaban los de aumentar la velocidad de la respiración e impedir totalmente la síntesis de ATP. En la jerga bioquímica, a los compuestos que ejercen estas acciones se les conoce como “desacoplantes”. Cuando hicimos estos estudios, ya había varios desacoplantes descritos; sin embargo, la triamcinolona tenía una estructura química diferente. Además, gracias a la neurosis del doctor Peña con los cationes monovalentes, encontramos que la triamcinolona actuaba como desacoplante sólo cuando el medio de reacción contenía iones potasio. Si se omitía el potasio de los medios de incubación o se le sustituía por sodio, la triamcinolona no ejercía ningún efecto.

Las características de la acción de la triamcinolona eran únicas. De hecho, los hallazgos con la triamcinolona fueron de los primeros trabajos que mandamos para su publicación. No tuvimos problemas para que los aceptaran, y en ocasiones hasta nos dijeron que los hallazgos eran muy interesantes, en particular los requerimientos de potasio. El problema con el que nos enfrentamos fue el de explicar los mecanismos que participaban en la acción del esteroide y por qué se necesitaba el ión potasio.

Recuerdo que pocas veces he tenido tantas discusiones. Mis compañeros y yo discutíamos por horas; teníamos seminarios, revisábamos la literatura, hacíamos más experimentos, y volvíamos a las discusiones. De todo eso, lo único que se hizo claro fue que la acción de la triamcinolona no se podía explicar mediante ninguno de los mecanismos descritos y que, por tanto, su acción se ejercía a través de un mecanismo desconocido. Pero, ¿cuál?

Por esos años, muchos investigadores de prestigio y experiencia habían propuesto un mecanismo de cómo la respiración estaba ligada a la síntesis de ATP. Creo que debo decir algo al respecto. El dogma de la bioquímica en esa época era que todo mecanismo que ocurría dentro de las células tenía que involucrar moléculas que se podían aislar y ser susceptibles de ser estudiadas en su forma aisla-

da. De hecho, la bioquímica clásica la establecieron investigadores con antecedentes fuertes en química orgánica. Por lo tanto, no es sorprendente que los grandes de esa época propusieran, con ciertas variantes, la “hipótesis química” de la fosforilación oxidativa. Esencialmente, se proponía que durante el transporte de electrones se formaba un intermediario (una molécula) químico de alta energía y que éste era el que donaba la energía para que el ATP se sintetizara a partir de ADP y fosfato. Tratamos de acomodar, teórica y experimentalmente, la acción de la triamcinolona dentro del mecanismo químico, pero nada nos dejaba satisfechos. Algo faltaba.

También por esos años, y gracias al trabajo de varios laboratorios en distintas partes del mundo, se estableció que en la membrana interna de las mitocondrias existe toda la maquinaria de la fosforilación oxidativa. Esto indicaba que la reacción que se quería descifrar ocurría en las membranas. Pero, entonces, ¿qué ocurre en las membranas y por qué todos los componentes de la fosforilación oxidativa están en las membranas? Como se mencionó arriba, las mitocondrias tienen la capacidad de hincharse y contraerse. Esto implica que las mitocondrias pueden acumular y expulsar agua a través de sus membranas y que este fenómeno se acompaña del paso de iones. De hecho, algunos investigadores calificaron a las mitocondrias como osmómetros perfectos. Pensamos que valdría la pena estudiar si la triamcinolona producía cambios de volumen en las mitocondrias. Los resultados fueron sorprendentes, pues la triamcinolona ocasionaba que las mitocondrias se hincharan en unos cuantos segundos, siempre y cuando el medio tuviera iones potasio. Creo que por primera vez se estaba observando una conexión entre el paso de iones a través de la membrana y la fosforilación oxidativa. Las perspectivas que se abrían eran enormes.

## La tragedia

Mis compañeros y yo hicimos cientos de experimentos para determinar la acción de la triamcinolona en las distintas funciones de las mi-

tocondrias. Todos los resultados fueron reproducibles y congruentes. En esos experimentos usamos mucha triamcinolona, y con frecuencia visitábamos a Squibb (a través del doctor Laguna) para que nos regalaran más triamcinolona. Siempre fueron gentiles. Sin embargo, un día nos dieron un lote de triamcinolona que no ejercía ningún efecto sobre las mitocondrias. Creo que pensamos en todas las posibilidades: que no nos habían dado triamcinolona (no fue cierto), que se había echado a perder durante su almacenamiento (no fue cierto), y que los lotes anteriores tenían un contaminante que era el responsable de sus efectos (que sí resultó cierto). Tratamos de aislar ese contaminante. En realidad, el que sufrió heroicamente ese proceso fue el doctor Edmundo Chávez (ahora jefe de la División de Investigación en el Instituto Nacional de Cardiología), pero fracasamos, debido, en parte, a que el contaminante existía, pero en concentraciones que calculamos que eran del orden de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ . Más adelante, otros investigadores encontraron que el contaminante era valinomicina. Llegamos a la conclusión de que la valinomicina (ver abajo) provenía del hongo que se usaba en uno de los pasos del proceso sintético.

### Conclusiones y una incógnita

En retrospectiva, teníamos los principales ingredientes para formular el mecanismo de la fosforilación oxidativa. Sabíamos que la triamcinolona era un agente desacoplante, que su acción requería potasio y que la triamcinolona facilitaba el paso del ión potasio a través de la membrana interna de las mitocondrias. Sin embargo, nunca sabré si con esa información hubiéramos podido formular el mecanismo correcto de la fosforilación oxidativa. De hecho, casi simultáneamente con los reportes de la triamcinolona, los doctores Cyril Moore y B. Pressman publicaron el primer trabajo sobre la valinomicina. Los efectos de este antibiótico eran muy similares, o idénticos, a los que habíamos obtenido con la triamcinolona. Sin embargo, su interpretación de los resultados no fue del todo correcta. Quien tuvo la inspiración para formular el mecanismo de la fosforilación oxidativa, y dar

una nueva dimensión a las membranas, fue el doctor Peter Mitchell. En 1961, Mitchell publicó una nota en que proponía que el “intermediario” de la fosforilación oxidativa no era una entidad química, sino un potencial electroquímico.

1965-1975

En esta década se dieron pasos muy importantes relacionados con la manera en que la secuencia de bases en el ADN da lugar a la formación de una proteína. Se empezaba a visualizar la complejidad del proceso y su regulación. Por otro lado, se hicieron estudios que sugerían fuertemente que en las mitocondrias también existía ADN y que éste podría tener función. También se hicieron avances importantes sobre las propiedades y estructura de las membranas y, gradualmente, surgió el modelo que explicaba muy satisfactoriamente sus características y funciones. A este respecto, me gustaría mencionar que, en esos años, los biofísicos entraron de lleno a la bioquímica, o viceversa: los problemas se empezaban a hacer demasiado grandes para una sola disciplina. En cuanto a la fosforilación oxidativa en mitocondrias y la fotofosforilación en cloroplastos, el problema estaba dividido entre los pro-Mitchell y los anti-Mitchell. Nunca un problema se ha examinado con tanto detalle y por tantos investigadores.

Después de nuestra experiencia con la triamcinolona, continuamos estudiando las mitocondrias, pero a los esteroides ni los tocábamos. En esos años, el punto a explorar era si, en realidad, en las membranas mitocondriales existen sistemas de transporte. Por lo tanto, nos sumamos a muchos otros investigadores y estudiamos si los iones podían moverse a través de las membranas mitocondriales. Claramente vimos, al igual que muchos otros, que el sodio, el potasio y los protones pueden ir y venir a través de la membrana interna de las mitocondrias. Pudimos establecer, aunque en forma indirecta, algunas características del sistema de transporte de potasio. En nuestros laboratorios, y en muchos otros, se observó de manera muy

convinciente que los movimientos de cationes estaban ligados al movimiento de aniones. Sin embargo, lo más impresionante era que el transporte de cationes y aniones dependía de la energía que proviene del paso de electrones a través de la cadena respiratoria o de la hidrólisis de ATP. Para cualquier persona que hubiera estudiado el artículo de Mitchell, era claro que todas esas observaciones únicamente se explicaban mediante la hipótesis quimiosmótica. Por lo tanto, creo que el trabajo y las aportaciones de investigadores en muchos países del mundo fueron los que finalmente le dieron validez a una de las ideas más importantes del siglo pasado.

Pero, otra vez, se vuelve a lo mismo. La hipótesis quimiosmótica es correcta pero, ¿cómo se lleva a cabo el transporte de iones a través de la membrana?, ¿cómo son las moléculas que existen dentro de las membranas?, ¿son ellas las responsables del transporte?, ¿tienen esas moléculas alguna característica particular? Otra vez las incógnitas. El camino para contestar esas preguntas era claro: aislar y caracterizar a esas moléculas en sistemas libres de otras moléculas membranales. Me permito recordar que me estoy refiriendo a los años de 1965 a 1975, en los que los sistemas cromatográficos de separación de proteínas no estaban muy bien desarrollados. Además, y éste era el principal problema, se trataba de aislar proteínas membranales, y en la literatura había muy poca información sobre cómo tratar a proteínas que están dentro de un ambiente lipídico. De hecho, las proteínas membranales son insolubles en medios acuosos, y toda la bioquímica se había desarrollado en sistemas acuosos. Todo esto implicaba que, si se quería seguir adelante, se tenían que diseñar nuevas metodologías.

Para complicar el panorama, se presentaba otro problema. Si se logra aislar una proteína membranal, ¿cómo estudiarla? Supóngase que lo que se aisló es una proteína que transporta un ión a través de una membrana. Entonces, ¿cómo se va a medir su función? Necesariamente, se tiene que medir transporte pero, ¿cómo se mide transporte en un medio libre de los otros componentes de las membranas? Afortunadamente, muchos investigadores se dieron cuenta del pro-

blema y empezaron a desarrollar las llamadas “membranas artificiales” o “membranas modelo”. Dentro de éstos se encontraba el doctor Mauricio Montal, del CINVESTAV (ahora en California), quien por algún tiempo trabajó en nuestros laboratorios. Ese grupo de investigadores, a través del tiempo, logró establecer sistemas fantásticos en los que (ahora) se pueden reconstituir proteínas de membrana y estudiar sus funciones.

Pero, de cualquier forma, la doctora Tuena, el doctor Edmundo Chávez y yo llegamos a la conclusión de que, si queríamos conocer mecanismos, teníamos que enfrentar el problema de aislar, purificar y estudiar las proteínas en su forma aislada. Como era de esperarse, el camino no fue fácil. Pero algo salió.

Yo estaba muy tranquilo en el laboratorio, pero la doctora Tuena y el doctor Laguna me convencieron de que la doctora y yo deberíamos disfrutar un año sabático. La doctora y yo fuimos a la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins, al laboratorio del doctor Albert Lehninger, y nos dedicamos a aislar el transportador de calcio mitocondrial. Otra vez, en retrospectiva, no pudimos escoger peor acarreador. Éste probablemente sea el acarreador que más dificultades y problemas ha causado. En aquellos años, no lo sabíamos, así es que lo intentamos.

Ya que los sistemas de membranas modelo y la incorporación de proteínas a dichas membranas no se habían desarrollado, uno de nuestros principales problemas era cómo medir su función. El problema lo resolvimos, parcialmente, haciendo una suposición. Si la proteína que queremos aislar transporta calcio, en un momento dado, esa proteína debe tener la capacidad de unir calcio. Por lo tanto, nos dedicamos a sacar proteínas de las membranas mitocondriales mediante cuanto método se nos ocurría, o se describía en la literatura, y a medirles su capacidad para unir calcio. El problema con este enfoque (que lo saben todos los que han trabajado con calcio), es que el calcio es muy pegajoso, se une a todo. Otra vez, a pensar y discutir, y llegamos a otra posibilidad. En Johns Hopkins se habían hecho estudios sobre el transporte de calcio en mitocondrias, y se había visto



que el acarreador era capaz de transportar calcio cuando éste estaba en concentraciones nanomolares; en el vocabulario bioquímico, el acarreador tenía una afinidad muy alta por el calcio. Por lo tanto, surgió la idea de que la proteína que unía calcio con mayor afinidad debe, en principio, ser el acarreador de calcio. Obtuvimos una proteína que unía calcio con afinidades del orden nanomolar.

Cuando estábamos obteniendo estos datos, nos enteramos de que el doctor Ernesto Carafoli —entonces en la Universidad de Modena— también había aislado una fracción mitocondrial que unía calcio con afinidades semejantes, y que parecía ser idéntica a la nuestra. Entre Carafoli, Lehninger y nosotros llegamos al acuerdo de que los hallazgos de ambos laboratorios se publicaran en la misma revista y al mismo tiempo. Otro dato que también surgió en esos días, y que fue de importancia para el trabajo, lo obtuvo el doctor Cyril Moore (que ya mencioné anteriormente y que, para esas fechas, era compadre del doctor Antonio Peña). Moore publicó un trabajo en el que describía que unas cuantas nanomolas de un compuesto llamado rojo de rutenio inhibían totalmente el transporte de calcio mitocondrial. Esto sugería fuertemente que el rojo de rutenio, al unirse al acarreador de calcio, bloqueaba su función. Obviamente, los siguientes experimentos fueron los de probar el efecto de rojo de rutenio en nuestra preparación. Fue realmente muy emocionante ver que el rojo de rutenio inhibía la unión de calcio a nuestra proteína. Muy contentos, la doctora y yo regresamos a México.

No quiero dar la impresión de que con esos estudios se resolvió el problema del acarreador mitocondrial de calcio. Han pasado más de treinta años y el problema no se ha resuelto. En este sentido, creo que los estudios más importantes los han hecho el doctor Edmundo Chávez y la doctora Cecilia Zazueta, en el Instituto Nacional de Cardiología. En los últimos años, ellos han logrado aislar una fracción proteica que transporta calcio en sistemas modelo. Está compuesta por dos proteínas, una de ellas es una glicoproteína que confiere sensibilidad al rojo de rutenio a la segunda proteína. Tal vez sea la que aislamos hace unos treinta años.

Durante los estudios sobre el aislamiento del acarreador mitocondrial de calcio establecimos una amistad muy estrecha con el doctor Ernesto Carafoli, y durante algún tiempo trabajamos sobre la relación entre el transporte de calcio, la fosforilación oxidativa y la actividad ATPasa. En esos estudios, la conexión entre los laboratorios del Carafoli y el nuestro y el motor de la investigación fue la doctora Marina Gavilanes (ahora en la Facultad de Química de la UNAM). Con los experimentos que ella llevó a cabo en los dos laboratorios pudimos entender algo acerca de cómo los sistemas de transporte se conectan con los de la síntesis de ATP.

### 1975-2003

En 1975, las relaciones entre el ADN y la síntesis de proteínas eran bastante claras, y en muchos laboratorios del mundo se empezaron a dar los primeros pasos para la manipulación del sistema. De 1975 a 1980 se empieza a visualizar el impacto que la biología molecular tendría en la investigación bioquímica y en el desarrollo de la biotecnología. Muchos investigadores empezaban a utilizar con mucho éxito estas herramientas. Se cuenta con un modelo general y convincente de la estructura general de las membranas biológicas. Se empezaron a vencer las barreras que impedían el aislamiento de proteínas membranales y se llevaron a cabo estudios sobre participación del agua en la catálisis y en la estabilidad de las enzimas. A partir de 1980 (por poner una fecha), la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear empezaron a ser accesibles para muchos investigadores. El campo de las señales intracelulares empezó a mostrar la complejidad molecular de los seres vivos. Con el correr de los años, las metas en la investigación son cada vez más ambiciosas y, en la década de los noventa, aparece en forma masiva la investigación multidisciplinaria.

Como consecuencia de los logros de la biología molecular y otros avances tecnológicos, la bioquímica empieza a avanzar demasiado rápido. Casi diariamente se describen trabajos en los se abordan con

mucha precisión problemas que unos pocos años antes era imposible abordar. Las enzimas se empiezan a estudiar desde el punto de estructura fina y en condiciones que antes se pensaban incompatibles con sus funciones. Todo lo que estaba ocurriendo era una invitación para estudiar los fenómenos biológicos con enfoques que se apartaban mucho de la bioquímica tradicional. Empezamos a utilizar mucho de lo que la ciencia estaba ofreciendo y se abrieron panoramas extraordinarios. A partir de 1980, es difícil describir nuestro trabajo cronológicamente. Las cosas sucedían demasiado rápido, y en ocasiones un problema se empalmaba con otro. Por lo tanto, creo que es mejor describir por separado cada una de las rutas que tomó nuestra investigación.

### La ATP sintasa o ATPasa

El sueño de todos los bioquímicos, incluyéndonos a nosotros, es explicar los fenómenos biológicos en términos moleculares exactos. Esto es extremadamente difícil, o imposible, en ausencia de metodologías que permitan un análisis fino de las macromoléculas; en nuestro caso, las enzimas relacionadas con la síntesis de ATP y transporte. Me voy a permitir dar un ejemplo. Antes de que se desarrollaran los sistemas de análisis de proteínas por medio de electroforesis en geles de acrilamida, era prácticamente imposible saber cuáles y cuántos componentes formaban la enzima que a uno le interesaba. Ahora, esta técnica es de rutina y cualquier estudiante puede saber en unas cuantas horas cuántas subunidades diferentes o iguales son parte de dicha enzima. De hecho, en los estudios sobre los sistemas enzimáticos mitocondriales, la falta de estas metodologías dio lugar a muchos errores y mucha confusión.

En el momento en que esas metodologías se hicieron accesibles, en muchos laboratorios del mundo se inició la marcha hacia el conocimiento fino de las enzimas, y cómo éstas llevan a cabo su función. Durante esos años nuestra atención se empezó a centrar sobre la ATPasa o ATP sintasa mitocondrial. Esto se debió a que, en nuestros

estudios sobre los efectos de iones en las enzimas de la fosforilación oxidativa, habíamos encontrado que los cationes afectan favorablemente la actividad de una enzima, que se denominó como ATPasa o ATP sintasa. Para todos los seres vivos, ésta es una enzima importante, ya que es la encargada de sintetizar casi todo el ATP que necesitamos para vivir. Debo mencionar que la enzima, además de sintetizar ATP, también tiene la capacidad de hidrolizar ATP.

La pregunta que obviamente surgió del efecto de los cationes monovalentes en la ATPasa es: ¿cómo lo hacen? En uno de muchos proyectos, pensamos que valdría la pena estudiar el efecto de cationes que estuvieran unidos a cadenas con distinto número de carbonos e hidrógenos. En efecto, en colaboración con el doctor Blas Lotina (Facultad de Química de la UNAM), vimos que los cationes unidos a una cadena de carbonos e hidrógenos ejercían una acción inhibitoria sobre la actividad enzimática de la ATPasa; entre más larga era la cadena a la que el catión estaba unido, más efectiva era su acción. No habíamos contestado cómo los cationes afectan la actividad de la ATPasa, pero el hallazgo nos permitió iniciar algunos estudios sobre la relación entre la estructura y la función de las proteínas a nivel molecular.

Cuando hicimos las observaciones anteriores, ya se habían publicado los primeros trabajos sobre la llamada cromatografía por afinidad. Esto consiste en pegar covalentemente, a una resina inerte, un compuesto que se sabe que se une a la enzima que se desea aislar. La resina con el compuesto unido se coloca en una columna, y sobre ella se pasa un extracto de células que se sabe que contiene la enzima de interés. En condiciones ideales, todas las proteínas, excepto una, pasan por la columna. La que se queda en la columna es la que reconoce al compuesto que estaba unido a la resina. Por lo tanto, en un paso posterior, simplemente se pasa algo que desprege a la enzima de la columna y se recoge la enzima sin ningún otro componente. Probamos la metodología con una resina que tenía unido un catión de seis átomos de carbono. El sistema funcionó y, por lo tanto, logramos obtener a la ATPasa libre de otros componen-

tes celulares. ¡Al fin podíamos estudiar una enzima sin la interferencia de otros factores!

### La ATPasa y la proteína inhibidora

Mientras llevábamos a cabo el aislamiento de la ATPasa, también estudiábamos el mecanismo por el que los cationes unidos a una cadena de carbonos inhibían la actividad de la ATPasa. De manera muy intrigante, encontramos que la acción de estos cationes era semejante a la de una proteína que es parte de la ATPasa. Dos investigadores, Pullman y Monroy, la habían aislado algunos años antes y la llamaron “inhibidor natural de la ATPasa mitocondrial”, debido a que inhibía la función hidrolítica de la ATPasa. Por lo tanto, empezamos a estudiar la relación entre la proteína inhibidora y la ATPasa mitocondrial. Confirmamos los hallazgos de Pullman y Monroy, en el sentido de que la proteína inhibe la actividad hidrolítica de la ATPasa. También, en la literatura se mencionaba y se aceptaba que la proteína inhibidora *no* inhibía la síntesis de ATP.

Todo mundo estaba de acuerdo en los resultados experimentales, pero algo andaba mal. Las observaciones indicaban que la proteína inhibía la hidrólisis, pero no la síntesis de ATP. Esto es contrario a los principios de la termodinámica, en el sentido de que, en una reacción dada, no pueden existir inhibidores unidireccionales. El punto se tenía que aclarar. Así es que la doctora Tuena y yo fuimos al Instituto Arrhenius de la Universidad de Estocolmo, a trabajar en el laboratorio del doctor Lars Ernster. Esto fue por varias razones, entre ellas, porque Ernster y sus colegas habían desarrollado de manera excelente la preparación de partículas submitocondriales (el sistema ideal para los experimentos que deseábamos hacer), y además tenían la proteína inhibidora en abundancia.

Los experimentos marcharon sin grandes problemas. Siguiendo los protocolos de la literatura, confirmamos que la proteína inhibidora no inhibía la síntesis de ATP. Sin embargo, cuando examinamos la síntesis de ATP en los segundos iniciales de la reacción, encontramos

que en esos intervalos de tiempo, la proteína inhibidora sí inhibía la síntesis de ATP. Disecamos el problema y, finalmente, llegamos a la conclusión de que el primer efecto del potencial electroquímico (para estos años la hipótesis ya estaba totalmente aceptada) es el de desplazar a la proteína inhibidora de la ATP sintasa, y así permitir que la síntesis de ATP se lleve a cabo. Esto fue de interés, pues lo que estábamos observando era el reflejo de cambios conformacionales de proteínas, inducidos por potenciales electroquímicos. Ahora, este fenómeno es muy conocido, principalmente por investigadores en el campo de los canales. A nuestro regreso, continuamos estudiando la función de la proteína inhibidora. La doctora Carmen Beltrán (ahora en el Instituto de Biotecnología de la UNAM) logró establecer las condiciones en las que la proteína se asocia y se disocia de la ATPasa. Esta información ha sido de mucho valor en los estudios sobre las características de la ATPasa, con y sin proteína inhibidora.

Una de las preguntas que surgieron de las observaciones de asociación y disociación de la proteína inhibidora de la ATPasa era en dónde se localiza la proteína inhibidora una vez que se desprende de la ATPasa. El doctor Jorge Dreyfus (Instituto de Fisiología Celular de la UNAM) tomó el problema. Dreyfus tiene experiencia en inmunología y, por lo tanto, su enfoque fue el de usar anticuerpos anti-proteína inhibidora para identificar el sitio de residencia de la proteína cuando está en su sitio inhibitorio y cuando no lo está. Sus resultados mostraron claramente que la proteína se movía de la ATPasa a algún otro lugar de la membrana. En otro laboratorio se llegó a una conclusión diferente; sin embargo, en la interpretación de esos resultados se hacían muchas inferencias. Creo que debo decir que, durante el tiempo que duró la discusión, el joven doctor Dreyfus se angustiaba y sufría mucho. Por lo tanto, la medicina para Dreyfus fue la de continuar profundizando sobre la acción de la proteína inhibidora. Se logró demostrar que la proteína se une a la ATPasa cuando la enzima adquiere una conformación que aparece durante el ciclo catalítico. Con este hallazgo se entendieron bien algunas de las características de la acción de la proteína inhibidora.

Cuando se llevaban a cabo esos estudios, otros grupos trabajaban (y continúan trabajando) vigorosamente sobre la identificación de todas las proteínas que participan en la función de la ATPasa o ATP sintasa. A través de los años se han identificado una multitud de proteínas. En unos de los trabajos se identificó, con cierta precisión, que la proteína inhibidora se une a una proteína de membrana. Es un placer para mí señalar que el doctor Dreyfus tenía razón.

La historia de la proteína inhibidora no se ha detenido. El doctor José de Jesús García (Instituto Nacional de Cardiología), que pasó algunos años con nosotros, investiga el ensamble de los componentes de la ATPasa y la acción de la proteína inhibidora en ciertas condiciones patológicas. Vale la pena mencionar que, en años muy recientes, el conocimiento de la ATPasa ha aumentado de manera dramática, principalmente porque un grupo inglés logró obtener la estructura cristalográfica de la ATPasa. El mismo grupo mostró que, en ciertas condiciones, la enzima puede existir como un dímero de dos ATPasas unidas por la proteína inhibidora. En estos trabajos no estaba claro si sus observaciones eran consecuencia de sus manipulaciones o si fisiológicamente existe esa condición. En colaboración con los futuros doctores J. Lenin Domínguez y Gerardo Pérez, vimos que el complejo ATPasa-proteína inhibidora en su forma natural puede existir tanto como dímero y como monómero. Sin embargo, en los últimos meses, otro grupo mostró datos que sugieren que la proteína inhibidora no es necesaria para la dimerización. ¡De nuevo, a las incógnitas! Esperamos que Lenin resuelva el problema antes de que obtenga su doctorado. Gerardo ahora anda muy ocupado, tratando de ver si a partir de datos termodinámicos puede obtener datos estructurales, y viceversa. Éste es un campo muy reciente, en el que se hace uso de los bancos de datos, mediciones calorimétricas y modelos computacionales. En mi opinión, el problema de Gerardo es un bello ejemplo de cómo se están usando las nuevas tecnologías en la adquisición de conocimiento.

De cualquier forma, los datos anteriores sobre la proteína inhibidora, y otros que han surgido de la literatura, sugieren fuertemente

que en la síntesis de ATP acoplada al transporte de electrones existen interacciones directas entre distintos componentes del sistema, y que éstas pueden tener implicaciones funcionales. Incluso, un grupo francés ha propuesto que dichas interacciones pueden ser las responsables de las distintas formas que pueden tomar las mitocondrias. Lo que quiero decir en este párrafo es que, cada vez que se cree que se está viendo el final, en algún lado del mundo surgen observaciones que abren nuevas incógnitas sobre lo que sucede en el interior de cada una de nuestras células.

### La energía, el ATP y el agua

En el Congreso Internacional de Bioquímica de 1979 se nos acercó un hombre que, sin preámbulos, nos pidió (en portugués) 100 mg de F1 (también así se llama la ATPasa). La doctora Tuena le preguntó: ¿y tú, quién eres? Era el doctor Leopoldo de Meis, de la Universidad Federal de Río de Janeiro. Ése fue el principio de una de las épocas más emocionantes de nuestra vida en la ciencia. Permítanme explicar.

En 1979, el mecanismo quimiosmótico sobre la síntesis de ATP estaba plenamente aceptado. Sin embargo, quedaba por indagar cómo la fuerza de un potencial electroquímico impulsaba la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato. Durante años, se había aceptado que el ATP, una de las moléculas más importantes del mundo biológico, es un compuesto de alta energía y que, por lo tanto, su síntesis a partir de ADP y fosfato requiere un aporte energético. Ya que el ADP y el fosfato tienen cargas negativas, se creía que la energía se requería para vencer la repulsión electrostática entre las dos moléculas. Sin embargo, de Meis tenía otra visión. Él pensaba que la principal barrera energética en la reacción del ADP con el fosfato era la solvatación. Es decir, si el ADP y el fosfato no estuvieran rodeados por capas de agua, entonces la formación del ATP debería ser espontánea o, cuando menos, debería requerir menos energía. Lo que en estos estudios estaba en juego era el conocimiento de las fuerzas que operan para que el ATP, la molécula que todos los seres



vivos utilizan para todos sus procesos endergónicos, sea una molécula de alta energía.

En estos estudios, uno de los problemas por vencer era cómo estudiar una enzima en condiciones en que no hubiera agua. Aquí debo señalar que el agua no es simplemente  $H_2O$ ; en realidad, el agua son muchos H y los O unidos con otros por los llamados puentes de hidrógeno. De tal manera, se pensó que la organización entre las moléculas de agua se podría romper si se perturbaban los puentes de hidrógeno. Se buscó esta condición y en la literatura encontramos que ciertos agentes (por ejemplo, el dimetil sulfoxido, DMSO) disminuyen el arreglo entre las moléculas de agua. La historia de este trabajo fue larga y extenuante. Sin embargo, después de algunos años de ensayos y errores, observamos que, en ausencia total de aporte energético, la ATPasa es capaz de sintetizar espontáneamente ATP a partir de ADP y fosfato, siempre y cuando el medio contenga un agente que perturbe la organización del agua.

Se estudió con cierto detalle la síntesis espontánea de ATP. Los resultados indicaron claramente que la energía de hidrólisis del ATP depende del ambiente en que se encuentre. En medios acuosos, el ATP es una molécula con alto contenido energético. Sin embargo, en sitios en que no hay agua, como, por ejemplo, el sitio catalítico de la ATPasa, el ATP es una molécula de baja energía. De hecho, vimos que en el sitio catalítico de la ATPasa la constante de equilibrio entre el ATP y el ADP y el fosfato es cercana a uno. Es necesario mencionar que, previamente, el doctor Paul Boyer había hecho experimentos que sugerían fuertemente que en el sitio catalítico de la ATPasa la síntesis del ATP era espontánea. Sin embargo, no se ofreció una explicación mecánica.

Los estudios sobre la energía de hidrólisis del ATP se continuaron en Río de Janeiro y en nuestros laboratorios aunque, en cierta forma, de manera independiente. En nuestros laboratorios, con la ayuda del DMSO, la doctora Tuena demostró que la ATPasa tiene la capacidad de sintetizar no sólo ATP, sino también pirofosfato. La demostración de que es posible tener síntesis neta de pirofosfato por

medio de transiciones de agua a dimetil sulfóxido ilustró muy bien que el agua es un participante activo de los procesos fisiológicos. Esto no sólo tiene implicaciones sobre la formación de enlaces de alta energía, sino, también, desde el punto de vista de la evolución de las enzimas que manejan compuestos de alta energía.

Durante el tiempo que colaboramos con De Meis, uno de los miembros de su grupo, el doctor Orlando B. Martins, hizo una estancia posdoctoral con nosotros y logró obtener información de valor sobre la regulación de la ATPasa por adenín nucleótidos. Orlando es una persona muy agradable, tanto, que durante su estancia en nuestra UNAM se casó con la doctora Mónica Montero, de nuestro Instituto. Ahora, ambos trabajan en la Universidad Federal de Río de Janeiro. En cierta forma, nos sentimos culpables por haber contribuido a la fuga de cerebros.

### Las enzimas y el agua

Tradicionalmente se ha considerado que, en el interior de nuestras células, el agua es un simple medio en el que están disueltas la mayoría de las miles de moléculas que constantemente se transforman en otras. Además, el agua es un medio ideal para que las moléculas se difundan rápidamente de un lado a otro. Por otro lado, la mayoría de nuestras enzimas son solubles en agua. Incluso los acarreadores y las otras enzimas membranales requieren que sus sustratos o ligandos lleguen a ellas a través del agua que las rodea. Todo esto llevó a muchos investigadores a considerar al agua como uno de los componentes más importantes de los seres vivos, pero nunca se pensó que el agua fuera un componente mecánicamente activo en los procesos biológicos. Sin embargo, los experimentos sobre la síntesis espontánea de ATP que se describieron arriba indicaban que el agua es un participante activo en la fisiología celular, y que, tal vez, mucho se pudiera aprender manipulando el agua.

Nuestra inquietud por el agua coincidió con la aparición de algunas publicaciones del doctor Alexander Klivanov, del MIT. Klivanov

se apartó del dogma de que las enzimas sólo pueden funcionar en sistemas acuosos. Lo que sus reportes decían era que las enzimas pueden funcionar en sistemas en los que prácticamente no hay agua. De hecho, él suspendía enzimas en solventes muy apolares como, por ejemplo, octano, y veía que las enzimas podían catalizar. De acuerdo con sus datos y los de otros investigadores, sólo eran necesarias unas cuantas moléculas de agua en la superficie de las enzimas para que éstas pudieran trabajar.

Aquí, es necesario mencionar otra característica de las enzimas: su estabilidad. Todos los bioquímicos saben que, si se coloca una enzima a temperaturas elevadas, pierde su función, debido a que pierde su estructura, fenómeno que se ha llamado desnaturalización. Es decir, las enzimas son estables, pero sólo dentro de un margen de temperatura relativamente estrecho. Klibanov también había observado que las enzimas suspendidas en solventes apolares adquirirían una estabilidad impresionante, en el sentido de que se requerían temperaturas decenas de grado más altas para desnaturalizarlas.

Por esos días platicamos con el doctor Alberto Darszon (ahora en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca). Él conocía muy bien las técnicas para incorporar proteínas a membranas y había hecho estudios con sistemas micelares. En una de tantas discusiones, decidimos que valía la pena estudiar el comportamiento de algunas enzimas en sistemas de bajo contenido de agua. Las enzimas que había estudiado Klibanov eran relativamente sencillas. Por lo tanto, una de las preguntas que nos hicimos fue determinar si todas las enzimas, independientemente de su complejidad estructural, mantenían su función en medios con bajo contenido de agua. Como no podíamos estudiar todas las enzimas, estudiamos, en colaboración con Guadalupe Ayala, una de las más complejas; por razones que no creo necesario explicar, escogimos a la ATPasa mitocondrial. Efectivamente, la enzima atrapada en micelas invertidas (algunos las llaman micelas reversas) funcionó. Las micelas invertidas son unas bolsas muy pequeñas, en las que se puede introducir la proteína que se desee con un contenido de agua que se puede controlar.

Nos pusimos ambiciosos y, en colaboración con el doctor Edgardo Escamilla (nuestro vecino en el Instituto de Fisiología Celular), que por años ha trabajado sobre los sistemas de transporte de electrones, exploramos si podíamos introducir complejos respiratorios a las micelas, y estudiar si en dichos sistemas había comunicación entre los complejos. Los resultados fueron positivos; en sistemas con un contenido de agua sumamente bajo, observamos que unos complejos se comunicaban con otros. Teníamos el récord mundial sobre los sistemas que podían funcionar en sistemas con bajo contenido de agua. Unos meses más tarde, el récord pasó a manos de un grupo suizo.

Sin embargo, nuestra meta principal en los sistemas con bajo contenido de agua era la de conocer la contribución del agua a las características generales de las enzimas. Seguíamos en colaboración con el doctor Darszon, y al grupo se unió la doctora Georgina Garza Ramos (ahora en la Facultad de Medicina de la UNAM). La pregunta específica que teníamos era la de cómo varía la velocidad a la que cataliza una enzima en relación con su estabilidad. Esto requiere una explicación.

Desde hacía varios años se sabía que durante la catálisis enzimática todas las enzimas sufren múltiples cambios conformacionales. Esto quiere decir que, durante el proceso catalítico, muchos, si no es que todos los átomos de la enzima, cambian de posición. Desde nuestro punto de vista, esto implicaba que, en el proceso, se tenían que establecer nuevas interacciones entre distintos átomos de la proteína y el agua que la rodea. También, durante la catálisis, muchos de los átomos de la proteína se esconden y, por lo tanto, se tienen que romper sus contactos con el agua. En otras palabras, nosotros visualizamos la catálisis enzimática como un ballet entre los átomos de la proteína y el agua que la rodea. Entonces, ¿cómo se afecta la catálisis en condiciones en que hay muy poco agua?

En cuanto a la estabilidad de las enzimas, se sabía que cuando una enzima se desnaturaliza o, sea, cuando pierde su estructura tridimensional, todos o muchos de los átomos que estaban escondidos quedan expuestos al agua, interactúan con ella y la proteína se queda permanentemente con una estructura incorrecta. Ya que el agua

es una parte importante en la pérdida de la estructura de las proteínas, ¿cómo es la estabilidad de las proteínas en medios con un bajo contenido de agua?

La doctora Garza Ramos abordó el problema y encontró unos datos impresionantes. Observó que, en la medida en que se disminuía la cantidad de agua en contacto con la enzima, la velocidad catalítica disminuía. Dentro de nuestra hipótesis, esto implicaba que, al disminuir la cantidad de agua en contacto con la enzima, los cambios conformacionales que sufría la enzima no se llevaban a cabo fácilmente; es decir, la enzima no podía moverse fácilmente, ya que faltaba agua para acomodar los grupos de la enzima que necesariamente se exponen durante el proceso catalítico. De igual importancia fue que ella observó que, en la medida en que se disminuía el agua, la enzima se volvía más resistente a la inactivación por calor. Dentro de nuestra línea de pensamiento, esto implicaba que, como no había agua para estabilizar las estructuras incorrectas, la enzima permanecía en su estado funcional.

En otras palabras, lo que habíamos visto es que el agua no es simplemente un medio en el que las enzimas trabajan y los metabolitos difunden. Lo que presenciábamos fue que los procesos de solvatación y desolvatación son fundamentales en la catálisis y en la estabilidad de las enzimas, y que, además, controlan la energía de hidrólisis de moléculas que tradicionalmente se han considerado de alta energía. El campo es bellissimo, sin embargo, por lo que se narra a continuación, no continuamos nuestros estudios sobre el papel del agua en los sistemas biológicos. Afortunadamente, la doctora Leticia Ramírez y el doctor Alejandro Fernández Velasco (en la Facultad de Medicina de la UNAM) los continuaron, hasta que nuevos hallazgos los llevaron por otros caminos.

### La triosafosfato isomerasa

A principios de los años 90, la doctora Tuena y yo fuimos a la Escuela de Medicina en Fort Worth a impartir unos seminarios. Al final de las

pláticas, se acercó el doctor Robert Gracy y nos dijo que quería conversar un rato; en realidad, platicamos durante muchas horas. El tema del doctor Gracy es el envejecimiento, en general, pero siento que lo que más le entusiasma es el “envejecimiento” de las proteínas. Él y su grupo habían estudiado el “envejecimiento” de la triosafosfato isomerasa (más adelante la describiré con un poco de detalle), y había visto que, cuando la enzima estaba en reposo, es decir, sin llevar a cabo catálisis, la enzima mantenía su estructura indefinidamente. Por lo contrario, cuando la ponían a trabajar, esto es, a llevar a cabo ciclos catalíticos repetidos, la enzima se volvía menos estable; es decir, la enzima perdía su estructura y función; o sea, que “moría” (estas observaciones de ninguna manera implican que para vivir más hay que dejar de trabajar). También el grupo de Texas había visto que la muerte de la enzima se debía a que, durante la catálisis, unos de los aminoácidos que forman parte de la enzima (asparaginas) se desamidaban. Las asparaginas están localizadas en una parte crítica de la estructura de la enzima y, por tanto, su desamidación es letal.

Gracy nos preguntó si, colocando a su enzima en sistemas de bajo contenido de agua, podíamos hacer que su enzima trabajara en “cámara lenta”. Entre otras cosas, eso era lo que había hecho Garza Ramos, ajustando la cantidad de agua en contacto con la enzima. Lo que habíamos concluido de los estudios de Garza Ramos era que, cuando las enzimas se colocaban en sistemas de bajo contenido de agua, todos o algunos de los pasos del ciclo catalítico tenían un tiempo de vida mayor. Lo que Gracy deseaba saber era si el tiempo que duraba la enzima en determinada conformación estaba relacionado con la desamidación. Para sus intereses y los nuestros, pensamos que valía la pena hacer algunos experimentos. Garza Ramos tomó el problema y estableció que, efectivamente, la desamidación depende de la vida media de las distintas conformaciones que ocurren en el ciclo catalítico, y no precisamente del número de ciclos catalíticos que la enzima lleva a cabo. Después de esta experiencia, continuamos trabajando con la triosafosfato isomerasa, hasta que surgió el evento que marcó el rumbo de mi trabajo en los últimos años.

## La triosafosfato isomerasa y los parásitos

En colaboración con el doctor Zubillaga Luna (ahora en la UAM), estudiábamos la transferencia de la triosafosfato isomerasa del agua a micelas invertidas y viceversa. Para estos estudios se hizo necesario que marcáramos la enzima con yodo radiactivo. El doctor Ruy Pérez Montfort, uno de mis colegas en el Instituto de Fisiología Celular, tenía muy bien montada la técnica; lo visitamos y gentilmente se ofreció a marcar nuestra enzima. Es necesario mencionar que el doctor Pérez Montfort y su grupo manejaban la metodología perfectamente. Sin embargo, cuando se trató de marcar a la triosafosfato isomerasa de levadura, se encontró que la enzima se rehusaba a marcarse con yodo. Varias veces intentaron marcarla, pero los resultados siempre fueron negativos. Lo más extraño de los experimentos era que las triosafosfato isomerasas que provenían de otros organismos se marcaban fácilmente. Algo muy raro estaba sucediendo.

Durante años se había visto que las enzimas que ejercen la misma función en distintos organismos (enzimas homólogas) son casi idénticas en su estructura y en su función. Sin embargo, los experimentos con las triosafosfato isomerasas de distintos organismos decían que entre ellas hay diferencias importantes. Empezamos a estudiar la evolución de proteínas, con el fin de entender lo que estaba sucediendo. Aprendimos que, en los procesos evolutivos que han ocurrido a través de muchos millones de años, las enzimas homólogas tienden a conservar sus estructuras tridimensionales. Esto es particularmente cierto en los sitios catalíticos, o sea, en los lugares en los que las enzimas llevan a cabo la química de la reacción. Sin embargo, también aprendimos que en otros sitios existen diferencias, que se perciben fácilmente cuando se examinan sus secuencias de aminoácidos. A través de la evolución, muchos de los aminoácidos se han sustituido por otros, otros se han eliminado y otros se han insertado. Desde esta perspectiva, se podría decir que, a pesar de que todas ellas ejercen la misma función y poseen la misma estructura tridimensional, cada enzima homóloga tiene su propia personalidad. So-

bre esta base surgió la hipótesis que nos ha mantenido ocupados a Pérez Montfort, su grupo y a nosotros por cerca de diez años. También es necesario hacer énfasis en que, a través de estos años, nos han ayudado mucho investigadores y grupos del Instituto de Química, de la Facultad de Medicina, de la Facultad de Química de la UNAM, de la UAM, y de la Universidad de Barcelona. Sin la colaboración de los investigadores de estas instituciones nunca habiéramos podido vencer muchas de las barreras que han surgido en el desarrollo del proyecto.

La hipótesis sobre la cual hemos trabajado es relativamente simple: la inhibición selectiva de enzimas homólogas de distintas especies es posible por medio de modificaciones o perturbaciones de aminoácidos o regiones de las enzimas que han sufrido cambios a través de la evolución, siempre y cuando estos sitios sean esenciales para la catálisis o estabilidad de las enzimas.

Los experimentos en los primeros años del proyecto mostraron que sí es posible alterar selectivamente las enzimas de determinadas especies por agentes que no tienen ningún o poco efecto sobre las enzimas homólogas de otras especies. Estos hallazgos fueron una franca invitación al diseño de inhibidores de las enzimas que se encuentran en organismos indeseables. En nuestro caso, la meta fue diseñar moléculas que, actuando sobre la triosafosfato isomerasa, ocasionaran la muerte de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*; estos parásitos son los agentes causales de la enfermedad de Chagas en el continente americano y de la enfermedad del sueño en África, respectivamente. Sin embargo, desde el inicio del proyecto, se hizo aparente que la enzima de *T. cruzi* posee características que la convierten en un blanco excelente para el diseño de inhibidores especie específicos. Por lo tanto, gran parte de nuestro trabajo se ha centrado en esta enzima.

Creo que es apropiado mencionar que, cuando iniciamos el proyecto, nada se sabía de la enzima de *T. cruzi*. Gracias a la experiencia de Pérez Montfort y su grupo (en particular Nallely Cabrera) y Abraham Landa (Facultad de Medicina de la UNAM), Pedro Ostoa



Saloma (ahora en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM) se logró clonar la enzima y expresarla en *Escherichia coli*. La enzima recombinante se purificó. Una de las bondades de estas técnicas es que, sin grandes esfuerzos, se pueden obtener cantidades relativamente grandes de la enzima; por muchas razones, eso es una delicia para cualquier bioquímico.

Es necesario señalar que para diseñar moléculas que actúen sobre un sitio específico de una enzima es necesario conocer su estructura tridimensional. En otras palabras, sólo si se cuenta con la estructura atómica, es posible diseñar moléculas que interactúen sobre un sitio definido. Por lo tanto, fue necesario obtener la estructura cristalográfica de la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi*. Ninguno de nosotros tenía experiencia en cristalografía. Sin embargo, el doctor Ernesto Maldonado (Instituto de Fisiología Celular de la UNAM) aceptó el reto y, en una verdadera hazaña intelectual, y con el apoyo de los doctores Manuel Soriano y Abel Moreno (Instituto de Química de la UNAM), Ernesto obtuvo la estructura cristalográfica de la enzima a una resolución de 1.8 Å. Para todos, fue una experiencia única ver la estructura atómica de la enzima con la que estábamos trabajando.

Unos pocos meses después, también por enfoques cristalográficos, Maldonado, el doctor Xiu-gong Gao (de la Universidad de Wunshi, quien hizo una estancia posdoctoral en nuestros laboratorios) y la doctora Adela Rodríguez (Instituto de Química de la UNAM) lograron definir el sitio de anclaje de moléculas hidrofóbicas. Estos datos fueron el punto de partida para que el ahora casi doctor Alfredo Téllez Valencia iniciara la búsqueda de moléculas que inactivaran específicamente a la enzima del parásito. El camino no fue fácil, pero finalmente Alfredo encontró unos compuestos que, a concentraciones bajas (micromolares), inactivan a la enzima con un alto grado de selectividad.

Mientras tanto, mis jóvenes colegas (Viviana Zomosa Signoret y Gabriel Mercado Besserer) tratan de entender las fuerzas que mantienen y dan origen a la estructura de la triosafosfato isomerasa. En

la medida en que nuestro conocimiento sobre las proteínas aumenta, cada vez nos asombramos más sobre las fuerzas que permiten que una proteína adquiera su estructura y función. Por ejemplo, el doctor Horacio Reyes Vivas (ahora en Instituto Nacional de Pediatría) nos mostró, de manera muy convincente, que la flexibilidad de las proteínas es un factor de importancia en la estabilidad y función de las enzimas. Lamentablemente, aún estamos muy lejos de entender los factores que determinan la flexibilidad de estructuras proteicas.

Hace unas tres semanas, el doctor Miguel Costas (Facultad de Química de la UNAM), un verdadero experto en calorimetría, empezó a estudiar la unión de los compuestos que descubrió Alfredo Téllez a la enzima de *T. cruzi*. También, con la ayuda del doctor Francisco López Calahorra, intentamos diseñar y sintetizar compuestos que actúen con mayor efectividad en la enzima del parásito. A través de los años se ha acumulado mucho conocimiento y se han desarrollado tecnologías poderosas. Esperamos que con estas herramientas podamos obtener moléculas que proporcionen alguna ayuda a los millones de personas que padecen la enfermedad de Chagas.

Junio 13 del 2003

Agradezco a la UNAM, y en particular a mis colegas y directores del Instituto de Fisiología Celular, por haberme tolerado durante casi cinco décadas. En realidad, ha sido muy emocionante y agradable estar en esta universidad. Sin embargo, siento que de ninguna manera he transmitido todo lo que mis compañeros y yo hemos sentido en el curso de nuestro trabajo. Por esta deficiencia, pido disculpas. Cada vez me convenzo más de que sólo los poetas pueden escribir sobre la ciencia.

*Semblanza del doctor  
Armando Gómez Puyou*

J. Adolfo García Sáinz  
Instituto de Fisiología Celular

El doctor Armando Gómez Puyou fue el primero del grupo de jóvenes que seleccionó el doctor José Laguna para formar su grupo de trabajo. Ellos fueron, además del doctor Gómez Puyou, los doctores Antonio Peña, Enrique Piña, Victoria Chagoya y Marietta Tuena. Todos ellos investigadores eméritos de nuestra UNAM y fundadores de nuestro Instituto de Fisiología Celular; cabeza y corazón de la dependencia.

Cuestionado en una ocasión sobre la razón de su éxito, el doctor Laguna, pionero de la bioquímica mexicana, contestó que se debía a que reclutaba gente por lo menos tan buena como él. Sin duda lo logró. ¿Qué veía el doctor Laguna en el joven Gómez Puyou? No es difícil suponerlo; ha sido siempre un ejemplo de dedicación de tiempo absoluto a la ciencia, una mente inquisitiva hasta el detalle, nunca satisfecho con respuestas parciales. Es un experimentador nato, que deja hablar al experimento, que no se casa con las hipótesis, nunca convencido de que las cosas ya se saben o se entienden suficientemente, un hombre que no deja nunca de cuestionar.

Conocí al doctor Gómez Puyou en 1972, cuando me incorporé al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina en calidad de “chícharo” de la doctora Chagoya. Él, la doctora Marietta Tuena y el doctor Peña compartían un laboratorio acompañados por Edmundo Chávez, Alfonso Cárabez y un grupo de estudiantes jóvenes. Su laboratorio era como un panal, en constante revuelo de sus elementos. Se podía escuchar el zumbido laborioso del trabajo; todos llegaban temprano a hacer su experimento y solamente alguna alegre ocurrencia de la doctora Marietta Tuena interrumpía momentáneamente el trabajo.

Los doctores Gómez Puyou y Tuena no han dejado de hacer su experimento diario en los más de treinta años que tengo de conocerlos. Disfrutaban mucho de unos pocos días de vacaciones al año y de los congresos y reuniones, pero siempre “ya les anda” por regresar a sus laboratorios para poder continuar con su trabajo. Son, sin duda, los más dedicados de los investigadores del Instituto.

Hablo del doctor Gómez Puyou y de la doctora Tuena juntos, no sólo porque han sido compañeros toda su vida, tanto en el trabajo como en el hogar, sino porque creo que, siendo tan diferentes, se complementan al grado de que es imposible separarlos. Son la fuerza, la direccionalidad, la organización y la eficiencia, con la alegría, la turbulencia catalítica y creadora. No han abandonado su tema de estudio de cerca de cuarenta años: la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. Su éxito quizá se deba a que se parecen a su tema de estudio, no sólo generan potencial electroquímico, sino que disfrutaban rotando, rotando y rotando para generar contribuciones al conocimiento, que son, en buena medida, como enlaces de alta energía.

El doctor Gómez Puyou ha trabajado en tres temas fundamentales, ciertamente interrelacionados en una derivación temporal. Puede considerársele como el “padre de la bioenergética mexicana”. Fascinado por los efectos de un contaminante presente en un esteroide sintético que estimulaba la respiración, prepara mitocondrias y las estudia con todo detalle. Posiblemente, las primeras preparaciones limpias de estos organelos en nuestro país. Durante años, estudian cómo se regulan los flujos de electrones y la síntesis de ATP, así como los efectos de los cationes monovalentes sobre la fosforilación oxidativa. Purifican partículas submitocondriales, reconstituyendo la respiración y la síntesis de energía. El doctor Gómez Puyou y la doctora Tuena purifican también la ATPasa sintetasas, la enzima responsable de la síntesis del ATP, y contribuyen a su conocimiento, caracterizando sus componentes y ciclos catalíticos, con una cantidad importante de trabajos en las mejores revistas internacionales de la especialidad.

Me percaté de algo, prácticamente al llegar al Departamento de Bioquímica en los años setenta: el reconocimiento nacional e interna-

cional del doctor Gómez Puyou. Como miembro de comités editoriales de revistas, hasta ahora mantiene una intensa interacción con grupos nacionales e internacionales. Poco después de mi ingreso al Departamento, organizó un curso de Bioquímica con profesores de la UNAM y de la Universidad Johns Hopkins, donde había colaborado con el doctor Albert Lehninger. Dado que este curso se sobreponía a mis cursos de medicina, me los “pinté”, para asistir al que considero como uno de los mejores cursos que he tomado en mi vida y que, sin duda, tuvo mucho que ver con mi carrera académica.

*De la mitocondria a la ATPasa y su estructura  
al papel de la hidrofobicidad en la catálisis,  
a la mutagénesis y a la estructura y diseño de inhibidores*

El doctor Gómez Puyou y la doctora Tuena siguen trabajando intensamente en la bioenergética, pero ahora el doctor Gómez Puyou, conjuntamente con el doctor Ruy Pérez Montfort y otros investigadores, ha organizado un excelente y numeroso grupo, interdisciplinario e interinstitucional, que se aboca al estudio de una enzima clave en el metabolismo: la fosfotriosa isomerasa, con el fin de diseñar inhibidores útiles en la terapéutica antiparasitaria. Todo ello basado en estudios de estructura tridimensional, con simulaciones, cristalografía y otras tecnologías de frontera. Este grupo, de mantenerse unido, sin duda habrá de dar qué decir en el futuro.

La obra del doctor Gómez Puyou se cristaliza en más de un centenar de publicaciones, en cerca de mil citas y en un número muy grande de alumnos formados, que trabajan independientemente en diversas instituciones del país y del extranjero. Ha sido y es miembro de muy diversas comisiones editoriales y dictaminadoras.

Pero no solamente los alumnos directos del doctor Gómez Puyou se han beneficiado con su enseñanza. Su devoción por el trabajo, su capacidad de análisis, su actitud de esperar la respuesta del experimento, su sentido de la obra completa y de que la publicación debe ser una contribución, han sido ejemplo para todos los que laboramos

en el Instituto. Está, además, siempre abierto y dispuesto a comentar y revisar los trabajos de otros investigadores o estudiantes, y siempre con una visión clara y constructiva, aun para analizar trabajos fuera de su área.

Realmente, es para mí un privilegio participar en este merecido reconocimiento al doctor Gómez Puyou como “Forjador de la ciencia en la UNAM”, como lo ha sido trabajar bajo la luz que emanan nuestros investigadores eméritos del Instituto de Fisiología Celular.

## Ciclo de conferencias «Mi vida en la ciencia»

<i>Fecha</i>	<i>Investigador</i>	<i>Dependencia</i>
20 de Mayo	Dr. Marcos Moshinsky Borodiansky	Instituto de Física
21 de Mayo	Dr. Julián Adem Chahín	Centro de Ciencias de la Atmósfera
22 de Mayo	Dr. Teófilo Herrera Suárez	Instituto de Biología
27 de Mayo	Dr. Fernando Alba Andrade	Instituto de Física
28 de Mayo	Dr. Gonzalo Zubieta Russi	Instituto de Matemáticas
29 de Mayo	Dr. Alfonso Escobar Izquierdo	Instituto de Investigaciones Biomédicas
3 de Junio	Dra. María Teresa Gutiérrez Vázquez	Instituto de Geografía
4 de Junio	Dr. Emilio Lluís Riera	Instituto de Matemáticas
5 de Junio	Dr. Arcadio Poveda Ricalde	Instituto de Astronomía
10 de Junio	Dr. Carlos Guzmán Flores	Instituto de Investigaciones Biomédicas
11 de Junio	Dr. Juan Manuel Lozano Mejía	Instituto de Física
12 de Junio	Dr. Humberto Cárdenas Trigos	Instituto de Matemáticas
17 de Junio	Dr. José Negrete Martínez	Instituto de Investigaciones Biomédicas
18 de Junio	Dr. Zoltan de Cserna-de Gömbös	Instituto de Geología
19 de Junio	Dr. Fernando Walls Armijo	Instituto de Química
24 de Junio	Dr. Alfonso Mondragón Ballesteros	Instituto de Física
25 de Junio	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo	Instituto de Química
26 de Junio	Dr. Eucario López Ochoterena	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
1 de Julio	Dr. Barbarín Arreguín Lozano	Instituto de Química
3 de Julio	Dra. Gloria Alencáster Ybarra	Instituto de Geología
8 de Julio	Dr. Luis Estrada Martínez	Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico
9 de Julio	Dr. Fernando Enrique Prieto Calderón	Instituto de Física
15 de Julio	<b>Dr. Armando Gómez Puyou</b>	<b>Instituto de Fisiología Celular</b>
16 de Julio	Dr. Ismael Herrera Revilla	Instituto de Geofísica
17 de Julio	Dr. Jaime Mora Celis	Centro de Investigación sobre Fijación del Nitrógeno
13 de Agosto	Dr. Luis de la Peña Auerbach	Instituto de Física
14 de Agosto	Dr. Agustín Ayala Castañares	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
19 de Agosto	Dr. Jorge Rickards Campbell	Instituto de Física
20 de Agosto	Dra. Guillermina Yankelevich Nedvedovich	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Lugar: Sala del Consejo Técnico de la Investigación Científica, 18:00 horas.

Son también «Forjadores de la Ciencia en la UNAM» el Ing. Marcos Mazari Méner, del Instituto de Física, y el Dr. Tirso Ríos Castillo, del Instituto de Química.

«Forjadores de la ciencia en la UNAM: Armando Gómez Puyou»

se terminó de imprimir en julio de 2003

en los talleres de Formación Gráfica, S.A. de C.V.,

Matamoros 112, Col. Raúl Romero, C.P. 57630,

Cd. Nezahualcóyotl, Estado de México.

Se tiraron 300 ejemplares más sobrantes para reposición.

El cuidado de la edición estuvo a cargo de

Augusto A. García Rubio Granados,

Secretario Técnico de Publicaciones y Ediciones.