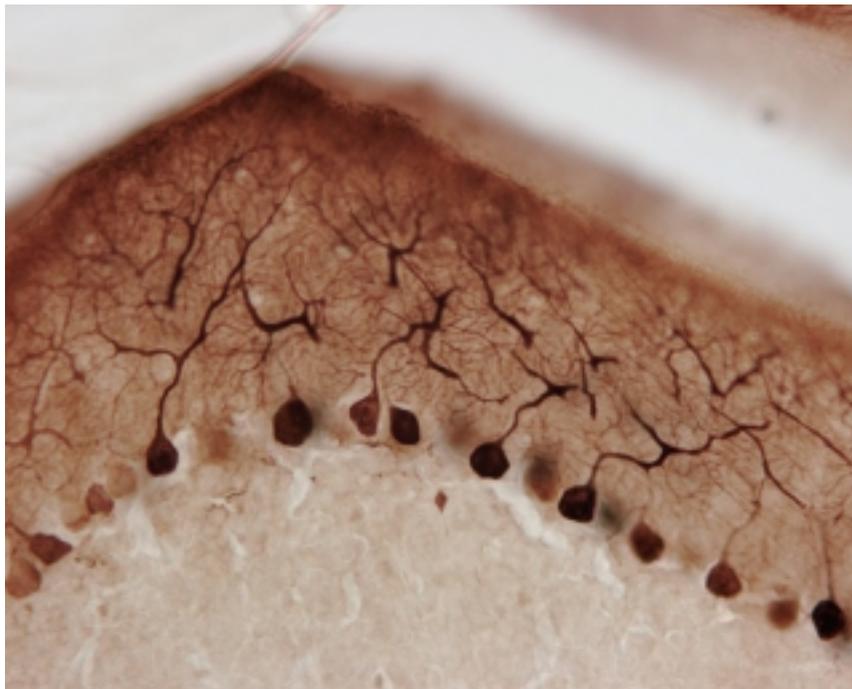


ENCUENTROS EN LA BIOLOGÍA



Editor:

Salvador Guirado

Comité editorial:

Ramón Muñoz-Chápuli,
Antonio de Vicente,
José Carlos Dávila,
Francisco Cánovas,
Francisca Sánchez

Editado con la financiación del
Vicerrectorado de Investigación y
Desarrollo Tecnológico de la
Universidad de Málaga.

El Centro de Profesorado de Málaga
colabora en la distribución de esta
publicación.

Diseño de la portada:

Salvador Guirado

Correspondencia a:

Encuentros en la Biología,
Salvador Guirado (Editor),
Depto. Biología Celular,
Facultad de Ciencias,
Campus de Teatinos,
29071 Málaga
Tfno.: 952 131961
email: guirado@uma.es

Dirección Internet:

[http://www.uma.es/publicaciones/
encuentros](http://www.uma.es/publicaciones/encuentros)

D.L.:MA-1.133/94

3 Resistencia bacteriana frente a antimicrobianos, ¿ los está haciendo inútiles el mal uso y el abuso?

Antonio de Vicente Moreno es Profesor Titular de Microbiología en la UMA.

5 Seres vivos: mucho más que un puñado de genes

Juan Carlos Aledo es Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular en la UMA.

Ignacio Fernández Molina es alumno de segundo ciclo en la UMA.

7 Predicción de estructura de proteínas empleando software libre

Aurelio A. Moya García es becario predoctoral en el Dpto. de Biología Molecular y Bioquímica de la UMA.

RESISTENCIA BACTERIANA FRENTE A ANTIMICROBIANOS, ¿ LOS ESTÁ HACIENDO INÚTILES EL MAL USO Y EL ABUSO?

Antonio de Vicente Moreno

Hace poco más de 70 años el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming supuso una revolución en el tratamiento de las enfermedades infecciosas que ha llevado a salvar millones de vidas. A lo largo de estos años se han incorporado al arsenal terapéutico alrededor de doscientos compuestos antibióticos, lo que aparentemente nos hacía presuponer que las bacterias patógenas terminarían siendo derrotadas en todos los frentes. Pues bien, la situación hoy no es tan optimista, muchos de esos antibióticos ya son inútiles, cada vez la resistencia bacteriana a distintos antibióticos está más extendida, y ya, enfermedades como la tuberculosis o la meningitis no se curan tan fácilmente. La alarma se está haciendo cada vez más generalizada, sobre todo desde que se han aislado varias cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina en hospitales de distintos lugares del planeta. Esta bacteria es el agente de múltiples infecciones hospitalarias, con frecuencia graves, y el aislamiento de cepas de *S. aureus* resistentes a todos los antibióticos salvo la vancomicina, una de las últimas líneas de defensa, no era infrecuente; así que... Este es además un hecho que se esperaba, la resistencia a antibióticos ha ido creciendo de forma constante, y ya se han aislado cepas de *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a todos los antibióticos disponibles en clínica [Levy S, *Investigación y Ciencia*, mayo: 14-21 (1998)].

La resistencia frente a antibióticos es la capacidad adquirida por un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico ante el que normalmente es susceptible. Los mecanismos de resistencia pueden ser diversos, por ejemplo mutaciones concretas que generan reducción en la permeabilidad para el antibiótico, o que modifican la diana de éste; o también mecanismos codificados por genes de resistencia específicos, como la producción de enzimas que inactivan el antibiótico (p.e. β -lactamasas, fosforilasas, acetilasas, etc.); o bien, mecanismos de bombeo que expulsan el antibiótico de nuevo al exterior de la célula por sistemas de transporte activo. Estos genes de resistencia específicos generalmente se asocian a plásmidos, los denominados plásmidos de resistencia, y con frecuencia en estos plásmidos se encuentran varios genes de resistencia frente a distintos antimicrobianos, de manera que las

cepas bacterianas que los portan son multirresistentes.

Los genes de resistencia estaban presentes en la naturaleza antes del uso clínico de los antibióticos -no olvidemos que la mayoría son de origen microbiano- producidos por bacterias aisladas de suelos; por eso no es de extrañar que estos genes de resistencia estén presentes en bacterias del suelo, aguas,... Pero el problema ha sido que con la difusión del uso de los antibióticos se ha sometido a muchas comunidades microbianas (p.e. la microbiota intestinal) a una fuerte presión selectiva. La presencia del antibiótico elimina a las bacterias sensibles, patógenas o no, y favorece por tanto la proliferación de las bacterias resistentes. Además, el hecho de que estos genes estén asociados a plásmidos permite la transmisión horizontal de la resistencia y favorece su difusión, incluso entre especies diferentes. Y es más, la multirresistencia a distintos antimicrobianos asociadas a un mismo plásmido favorece la selección cruzada de resistencias. En definitiva, el uso generalizado e indiscriminado de los antibióticos lleva inexorablemente al incremento de la resistencia bacteriana frente a los mismos.

En el empleo de los antibióticos se han cometido varios pecados, que sin lugar a dudas han contribuido a la pérdida de eficacia de los antibióticos. Aparentemente, quizás los más evidentes están asociados a su mal uso, incluso al abuso, en la terapia de las enfermedades infecciosas. En este sentido diferentes prácticas han contribuido a favorecer la proliferación de resistencias, como la administración incorrecta de los antibióticos, la automedicación, la aplicación incorrecta del tratamiento, ya sea por la aplicación de dosis insuficientes o la interrupción prematura de los tratamientos, o el uso excesivo de los antibióticos de amplio espectro, pero también su prescripción inadecuada, ¿cuántas veces se prescriben antibióticos para tratar infecciones respiratorias o resfriados que en la mayoría de los casos son de origen vírico? En este contexto, ¿nos puede extrañar que hoy día muchos de los tratamientos basados en amoxicilina no resulten eficaces?

Pero éste no ha sido el único factor que ha favorecido el espectacular crecimiento de la resistencia bacteriana. Grandes cantidades de antibióticos se han utilizado y siguen utilizándose de forma generalizada en agricultura y ganadería.

Una práctica muy extendida en la ganadería intensiva, sobre todo de pollos y cerdos, es la incorporación a los piensos de los denominados “estimuladores de crecimiento”, que favorecen el engorde más rápido de los animales; pues bien estos “estimuladores del crecimiento” son moléculas con estructura similar a los antibióticos, o sea antibióticos, y aunque su mecanismo de acción no está claro, muy posiblemente sea a través de la disminución de la microbiota intestinal de los animales. Está claro que la exposición prolongada a dosis bajas de antibiótico es la forma ideal para seleccionar bacterias resistentes, que desde estos animales se difundirán a sus cuidadores, consumidores, aguas residuales,... Varios trabajos [Aarestrup F y cols, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4127-4129 (2002)] han demostrado cómo los niveles de resistencia a antimicrobianos usados en producción animal son mayores en bacterias, p.e. enterococos, aisladas de cerdos en países donde el empleo de estos productos es mayor; y además en muchos casos asociada a la resistencia a otros antibióticos o metales pesados, como el cobre; recordemos el papel de los plásmidos en la multiresistencia. En la agricultura también se han aplicado antibióticos, como estreptomycin u oxitetraciclina, y otros bactericidas como sales de cobre, que también han generado drásticos incrementos de la resistencia a dichos agentes en las comunidades microbianas epifitas, que lógicamente luego se han diseminado a suelos, aguas, consumidores,.... Sin lugar a dudas, el empleo extensivo y muchas veces inadecuado de antibióticos en medicina, ganadería y agricultura es la principal causa de la creciente selección de bacterias resistentes.

Pero la situación puede complicarse aún más por la biología de las propias bacterias. Se ha puesto de manifiesto la importancia para muchas bacterias patógenas de poseer en su genoma fragmentos donde se agrupan diversos genes implicados en la virulencia, las denominadas islas de patogenicidad; pues bien, en una cepa de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, se ha asociado dicha resistencia con la presencia de una isla de patogenicidad [Shankar y cols., *Nature*, **417**: 746-750 (2002)]. Otro hallazgo importante ha sido el trabajo del grupo del Dr. Fernando Baquero en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, en el que demuestran una elevada frecuencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* “hipermutables” asociadas a pacientes de fibrosis quística. Los pacientes con esta enfermedad sufren con frecuencia infecciones por esta bacteria, debiéndose adaptar estas cepas al ambiente pulmonar altamente compartimentalizado y sometido a la presión

continua del sistema inmunitario y de la terapia antibiótica. En este trabajo, [Oliver A y cols., *Science*, **288**: 1251-1253 (2000)] se han aislado cepas de *P. aeruginosa* hipermutables del 36% de estos enfermos, que han persistido durante años en estos pacientes superando la fuerte presión selectiva, y que en ningún caso se han aislado de otros enfermos con infecciones agudas por *P. aeruginosa*. Las cepas hipermutables tienen una mutación en el gen *mutS*, que está implicado en la revisión y reparación de errores en la replicación del DNA, y por tanto presentan una muy elevada tasa de mutación, lo que aumenta fuertemente la probabilidad de encontrar mutaciones al azar que, entre otras cosas, pueden llevar a eludir la acción de los antibióticos.

Bien, como vemos la situación de la terapia antibiótica no es especialmente halagüeña, pero aún nos empeñamos en complicar más la situación de forma absurda. Todos podemos ver a diario en los anuncios publicitarios, la recomendación de usar jabones, detergentes, friegasuelos, lavavajillas, etc. con “antibacterias”. Esta nueva moda antibacteriana es una amenaza adicional, ya que la incorporación de cloruro de benzalconio, de compuestos de amonio cuaternario, entre otros, ha entrado de lleno en la fabricación de productos de higiene y limpieza, incluso se incorporan a objetos de uso cotidiano como juguetes, colchones o cubiertos. Este uso indiscriminado de compuestos antibacterianos, activos frente a todo tipo de bacterias, patógenas o no, nos llevará inexorablemente a seleccionar poblaciones bacterianas resistentes a estos productos, y a otros como antibióticos por selección cruzada, en los ambientes domésticos, en la microbiota asociada al cuerpo humano, aguas,... No cabe duda de que debemos cuidar la higiene personal y doméstica, ¿pero hasta el punto de declarar la guerra a todas las bacterias?, ¿y por qué estos productos y no seguir empleando los tradicionales, como lejía, alcohol o amoníaco, más baratos y que al evaporarse con rapidez no dejarán residuos que favorezcan las resistencias bacterianas? Esta actitud nos conducirá probablemente a inutilizar el arsenal de desinfectantes, como el de antibióticos, y que no sean útiles cuando realmente sean necesarios, para luchar contra las infecciones o para proteger a poblaciones especialmente susceptibles en hospitales, geriátricos, guarderías... Sin lugar a dudas, si seguimos en esta línea de mal uso y abuso de los antibióticos y antibacterianos, conseguiremos introducir en casa a estas bacterias multiresistentes, como ya lo están en los hospitales. ¿Y todo por...?

SERES VIVOS: MUCHO MÁS QUE UN PUÑADO DE GENES

Juan Carlos Aledo e Ignacio Fernández Molina

Vivimos un tiempo en el que los éxitos de la Biología Molecular son noticia. La oveja Dolly bien podría competir en popularidad con David Bisbal, y raro es el telediario en el que no se nos informa/desinforma sobre el hallazgo de un gen que nos permitirá curar no sé qué enfermedad. Los medios de comunicación han contribuido a difundir una falsa expectativa de las bondades de la ciencia moderna. Quizás por ello, no nos sorprende encontrar acalorados debates de cómo limitar en un futuro próximo los abusos de la biotecnología. ¿Sería o no ético manipular embriones para erradicar la violencia del comportamiento humano, o para crear individuos más inteligentes, etc.? Lo grave es que este injustificado optimismo haya calado en el seno académico. En un pasado curso de verano, un grupo de biólogos tuvimos oportunidad, como colofón al curso, de debatir sobre las limitaciones de la biotecnología. La opinión más extendida, y errónea a nuestro modesto entender, era que el fenotipo de un organismo se puede modificar a voluntad, sencillamente manipulando sus genes. Si se nos permite la ironía, diremos que posiblemente ello será así cuando los burros vuelen y las ranas crien pelos, ya sean estos burros y estas ranas transgénicos o no.

Si el objetivo de la biotecnología es modificar a voluntad el fenotipo de los organismos, tenemos que considerar que son muchos más, en número, los intentos fallidos que los que culminan con éxito. La capacidad de manipular genes es un hecho del presente, sin embargo, una cosa son los genes y otra bien distinta son los organismos. Esta distinción es fundamental y, sin embargo, no siempre se realiza. Aquí se plantea una paradoja: la biotecnología tiene como fin último modificar organismos y, sin embargo, muy frecuentemente se olvida de éstos como tales, centrando todo el interés en los genes de dichos organismos. Los genes, aún siendo importantes, no son más que meros instrumentos de los que se valen las leyes para actuar, y no debemos confundirlos con las propias leyes. En otros términos, la ecuación que define lo que es un organismo en un instante determinado, es una función multivariante donde el genotipo no es la única, ni tan siquiera la principal, variable que determina el fenotipo.

Fenotipo = Genotipo + Ambiente + Historia + Azar

A nadie vamos a tener que convencer del papel que desempeñan el genotipo y el ambiente, y por tanto nos centraremos en algunos ejemplos que ilustran la importancia de los otros dos términos de

esta ecuación: la historia y el azar.

Historia

Aseguraba Borges que estamos hechos de tiempo. Podemos decir que el tiempo es un constituyente más de los sistemas biológicos, sobre todo cuando consideramos la vida como un proceso más que como una sustancia. Las leyes de la biología dependen de las leyes de la física y la química, pero también de una ingente cantidad de información sobre acontecimientos del pasado. Hay sistemas, tanto animados como inanimados, cuyo estado actual no está enteramente determinado por las condiciones actuales sino también por las pasadas. En otras palabras, la historia del sistema condiciona su presente y futuro. Imaginemos, por ejemplo, una suspensión de agar-agar. A 60°C podemos encontrarlo líquido o sólido, dependiendo de su historia previa. Si el agar se calienta hasta los 100°C y después se deja enfriar hasta los 60°C, el estado de dicho agar será líquido. Si por el contrario, tomamos agar sólido a temperatura ambiente y vamos calentándolo hasta alcanzar los 60°C, este agar permanecerá sólido (Ver figura 1A). Si el tiempo pasado es tan importante a la hora de determinar el estado de un sistema simple e inanimado como el agar, ¿qué influencia no tendrá en un ser vivo? Imaginemos ahora dos células de *Escherichia coli* genéticamente idénticas (igual genotipo), que se encuentran en el mismo medio (igual ambiente). Bien pudiera ser que ambas presenten, sin embargo, fenotipos muy distintos: una expresa los genes del operon *lac* mientras que la otra no; sencillamente porque la historia previa de ambas células es distinta. El operon *lac* contiene los genes que codifican para las proteínas implicadas en el metabolismo de la lactosa. Estos genes son expresados cuando una proteína reguladora que los reprime, deja de hacerlo al interactuar con lactosa. Por tanto, la lactosa induce su propio metabolismo. Pero el operón posee una característica que enriquece el comportamiento de la bacteria frente a la lactosa, ya que uno de los genes del operón codifica para un transportador de lactosa. Cuando hay lactosa en el medio, ésta entra y activa al operón, con lo que habrá más transportadores de lactosa y más lactosa intracelular con capacidad de activar el operón. Es un claro ejemplo de retroalimentación positiva. Así, aunque la concentración intracelular de lactosa necesaria para activar el operón es única, la concentración extracelular requerida para alcanzar dicha concentración intracelular es variable, dependiendo de la permeabilidad de la membrana

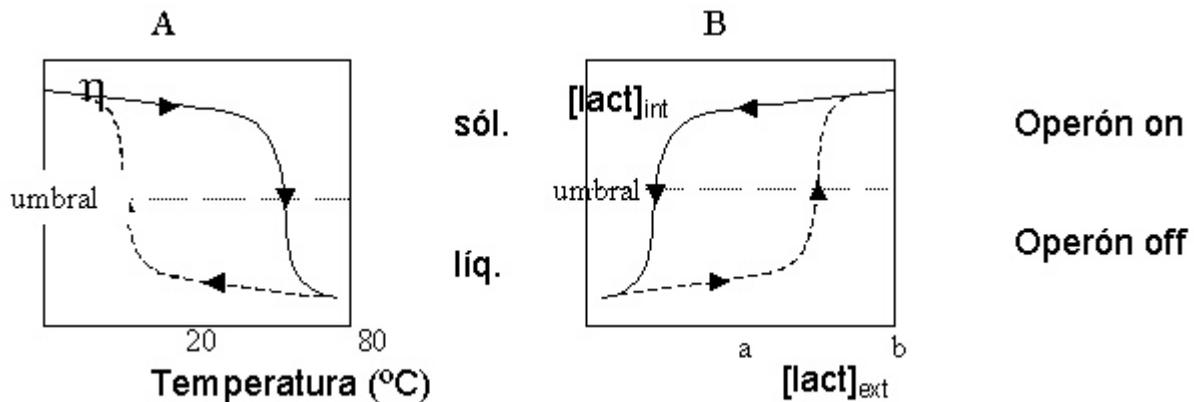


Figura 1. Sistemas con memoria molecular. (A) refleja un proceso de histéresis en el agar, cuya temperatura de fusión depende de si el paso es de sólido a líquido (curva continua), o de líquido a sólido (línea discontinua). Se representa viscosidad, η , frente a temperatura. (B) Con el operón lac en *E. coli* también se observa un fenómeno de histéresis. Para concentraciones intermedias de lactosa externa (entre a y b), los genes del operón pueden encontrarse activados o

(Fig. 1B). De esta forma, la permeabilidad de la membrana a la lactosa determina las concentraciones extracelulares umbrales necesarias para inducir o reprimir el operón, pudiendo ser muy diferentes según las circunstancias que hayan acompañado a la bacteria en el pasado (Fig. 1B). Así pues, en dos poblaciones genéticamente idénticas y en las mismas condiciones ambientales (igual concentración de lactosa en el medio), podemos encontrar células que están metabolizando lactosa y otras que no, debido a que las primeras estuvieron expuestas, en algún momento, a una concentración de lactosa en el medio suficientemente alta para inducir el operón, mientras que la otra no. Por este motivo, en esta población de bacterias la permeabilidad a la lactosa será alta, y la concentración de lactosa en

han tenido una misma historia, se pueden observar ligeras, y a veces no tan ligeras, variaciones morfológicas, distintas velocidades de desarrollo, y distintas concentraciones de las distintas biomoléculas presentes en cada célula (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 814-819, 1997). Esta inevitable variabilidad fenotípica se fundamenta en la naturaleza estadística de las leyes fisicoquímicas (ver *Encuentros en la Biología* **57**: 6-7). Esto es, cuando tenemos un sistema químico donde el número de moléculas reaccionantes es extremadamente bajo, como suele ser habitual en las células vivas, entonces las fluctuaciones aleatorias (ruido) son de magnitud considerable. De hecho, muchos circuitos genéticos emplean la redundancia, la retro-alimentación y otros artilugios para lograr una relación señal/ruido

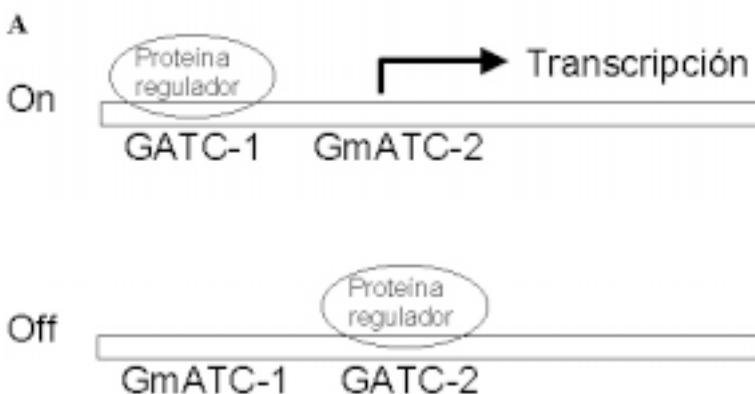


Figura 2. Regulación del operón Pap.

el medio necesaria para mantener al operón inducido, será menor que para la otra población.

Azar

Incluso en una población de células clónicas (igual genotipo) que se encuentren en un mismo entorno (igual ambiente) y que aparentemente

aceptable, cuando se requiere un funcionamiento determinista, es decir, no aleatorio (*Trends Genet.* **15**: 65-59, 1999). No obstante, las células también han aprendido a explotar en su beneficio esta azarosa variabilidad. Son muchos y heterogéneos los ejemplos conocidos que ilustran esta afirmación. El lector interesado puede dirigirse a la revisión (*BioEssays* **24**: 512-518,

2002) donde se describen algunos de estos ejemplos. Aquí, valga un botón a modo de muestra. Aunque más que de botones vamos a hablar de *pili*. Las bacterias pueden expresar un número de apéndices externos llamados *pili* que facilitan la adhesión de la bacteria a determinadas superficies, como por

ejemplo los órganos de los animales huésped. Por tanto, los *pili* son un determinante de virulencia de algunas bacterias patógenas. Un sistema bien estudiado es el que constituyen algunas cepas patógenas de *E. coli*. Que una de estas bacterias exhiba o no *pili* en su superficie depende del estado de activación de un operón llamado *Pap* (Pyelonephritis-associated pilus). Se ha comprobado que la activación/inactivación de este operón está estrictamente correlacionada con el estado de metilación de una región reguladora, que posee dos sitios de metilación, GATC1 y GATC2. La metilación de GATC2 (GmATC2) es necesaria para que se transcriba el operón (Fig. 2A). Hay una proteína reguladora, cuyo número por célula es bajo, que tiene una alta afinidad por los sitios GATC no metilados, de manera que se une a GATC1 o a GATC2 de forma aleatoria. Esta unión previene la metilación de dicho sitio. Si por azar la proteína reguladora se une a GATC2 protegiéndola de la metilación, se inhibe la transcripción del operón (Fig. 2B).

En una población genéticamente homogénea y en condiciones ambientales idénticas, encontraremos bacterias que posean *pili* y otras que no, ya que cada individuo echa a cara o cruz la

decisión de encender o apagar el operón responsable de la síntesis del *pilus*. No pretendemos ocultar que en ocasiones, la moneda utilizada puede estar trucada y que bajo determinadas condiciones ambientales las caras (digamos GmATC1) sean más frecuentes que las cruces (GmATC2); pero en cualquier caso, la expresión de *pili* es un proceso estocástico ya que aunque conozcamos el genotipo, el ambiente y la historia, nunca podremos precisar con grado de determinismo cuál será el fenotipo para un individuo dado. ¿Qué ventaja representa dejar al azar la expresión de *pili*? Para el individuo puede que ninguna, pero para la especie supone un enriquecimiento muy ventajoso. Los *pili* son estructuras altamente inmunogénicas, contar en todo momento con una subpoblación de bacterias que carezcan de estas estructuras, puede permitir evadir las defensas del huésped, para que más tarde, por azar, algunas de ellas vuelvan a desarrollar *pili* e infectar el tracto urinario.

Para finalizar nos gustaría hacer nuestras las palabras de Henrik Kacser, diciendo que cuando tratamos con seres vivos, el todo es mucho más que la suma de sus partes. Obstinarsse en ignorarlo es condenarse al fracaso.

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS EMPLEANDO SOFTWARE LIBRE

Aurelio A. Moya García

Las técnicas experimentales de caracterización estructural, principalmente cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear, proporcionan estructuras de alta resolución, aunque desafortunadamente sólo una pequeña parte de las proteínas se pueden caracterizar así. Para una gran parte de la fracción de secuencias cuya estructura no se puede determinar experimentalmente, los métodos computacionales de predicción de estructura nos ofrecen información valiosa, útil para explicar gran parte de los aspectos funcionales que se pueden derivar del conocimiento estructural.

Por otro lado, es obvio que la implementación de estas técnicas pasa por el desarrollo de *software* apropiado y que para resolver problemas biológicos mediante esta aproximación necesitamos usar ordenadores y programas específicos. Existe a nuestra disposición gran variedad de servidores y programas asequibles a coste ínfimo. En este artículo explicaré las bases de la predicción estructural de proteínas y las ventajas de realizar esta tarea empleando herramientas de código

abierto o con más propiedad *software* libre.

Métodos de predicción de estructura

El primer grupo de métodos de predicción de estructura que consideraré se denomina genéricamente métodos *de novo* o *ab initio*.

Estos métodos parten de la asunción de que la información necesaria para conocer la estructura tridimensional de una proteína está en su secuencia de aminoácidos. Buscan la estructura nativa como la conformación que corresponde al mínimo global de una función potencial determinada, que «representa» a la proteína y que se construye desde su secuencia. Para optimizar la función potencial emplean distintos métodos de búsqueda en el espacio de las conformaciones, los cuales suelen implementar algoritmos de mecánica molecular combinados con dinámica molecular [van Gunsteren W.F. y Berendsen H.J.C. 1977. *Molecular Physics* **34**:1311], simulaciones Monte Carlo (Combinación, Rosseta [Simons K. et al. (2000) *J. Mol. Biol.* **306**:1191]) o el empleo de bases de datos de elementos de estructura secundaria estándar

(FRAGFOLD [Jones D.T. 2001. *Proteins*;Suppl5:127]).

Los métodos *ab initio* son computacionalmente costosos y su fiabilidad disminuye con el tamaño de la proteína, generalmente funcionan bien con péptidos menores a 150 aminoácidos. La principal ventaja que tienen es que sólo se necesita la secuencia como información de partida, de modo que en principio es posible modelar proteínas que corresponden a plegamientos no conocidos.

En la práctica no se emplean para deducir la estructura de una proteína completa, sino como apoyo a otras técnicas más potentes y que consiguen más éxitos. Este conjunto de técnicas constituyen el segundo grupo de métodos de predicción, el modelado por homología (*Homology, Comparative Modelling*).

La idea básica de la que surge esta aproximación descansa en el hecho de que todas las parejas de proteínas que presentan una identidad de secuencia mayor al 30% tienen estructura tridimensional similar [Sander C. y Schneider R. 1991. *Proteins*9:56]. De este modo se puede construir el modelo tridimensional de una proteína de estructura desconocida, partiendo de la semejanza de secuencia con proteínas de estructura conocida [Blundell T.L. et al. 1987. *Nature* 326:347].

Las etapas necesarias para el modelado por homología son básicamente cuatro:

- Identificación de estructuras conocidas (moldes) relacionadas con la secuencia diana. Se emplean métodos de comparación de secuencias como FASTA [<http://fasta.bioch.virginia.edu/>], BLAST o PSI-BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>].

- Alineamiento de la diana con los moldes. Es la etapa más importante y la más delicada ya que la construcción del modelo se realizará conforme a este alineamiento. En este paso se emplean programas típicos de alineamiento de secuencias como CLUSTAL [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>].

- Construcción del modelo. Existen varias aproximaciones para construir las coordenadas espaciales de la secuencia diana desde el alineamiento realizado. Como ejemplo tenemos ProModII en el servidor SWISS-MODEL [<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>].

- Evaluación del modelo. La información que se puede obtener del modelo depende de su calidad, de modo que es importante poder evaluarla. Existen muchas pruebas que se pueden realizar sobre un modelo que incluyen comprobaciones estéricas, químicas, representaciones de Ramachandran, etc.

Para una revisión más detallada de estas etapas ver Martí-Renom et al. 2000. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:291.

Se estima que el modelado por homología es aplicable a un tercio de todas las secuencias proteicas conocidas [Rost B. y Schneider R. *Pedestrian Guide to Analysing Sequence Databases*. <http://www.cbi.cnptia.embrapa.br/SMS/bbnet/pedestrian/Springer96.html>] y esta cifra aumenta un 4% cada año, a medida que se determinan más estructuras correspondientes a nuevos plegamientos por vías experimentales. Aún así ¿qué pasa con el resto?

Cuando la similitud entre la secuencia diana y el molde es demasiado baja no es posible realizar un buen alineamiento y no se puede aplicar con éxito el modelado por homología. En estos casos aún podemos obtener información estructural de la proteína empleando técnicas de *threading*. En resumen consiste en colocar la secuencia problema en diferentes plegamientos conocidos y evaluar cómo se «encuentra de bien» o cómo encaja en cada uno de ellos. Por «encajar» se entienden cosas diferentes según el programa de *threading*: coincidencia de estructura secundaria, residuos en ambientes parecidos a como se encuentran en la base de datos, etc.

Pero para hacer todo esto hay que usar programas, ¿de qué tipo?.

Programas libres

Existe una gran variedad de programas para realizar predicciones de estructura de proteínas. Gran parte de ellos son desarrollados por investigadores que construyen sus propias herramientas para ser empleadas en la investigación, y que se ponen a disposición de la comunidad científica con el código fuente y permiso de realizar las copias necesarias, es decir, como *software* libre (no confundir con *shareware*. En la dirección <http://www.fsf.org/> hay abundante información sobre este tipo de software).

Estos programas además de herramientas son resultado de investigación científica, de modo que es de esperar que ese conocimiento sea puesto al alcance de toda la comunidad. Este intercambio de conocimiento, entre otras cosas, es lo que favorece el desarrollo de programas de ordenador libres.

Para una discusión más extensa sobre la difusión libre del conocimiento ver El futuro de la información: ¿vamos hacia donde queremos? de Jesús M. González Barahona, disponible en <http://sindominio.net/biblioweb/telematica/futuroinfo.pdf>

En definitiva, el uso de programas de ordenador libres en el ámbito científico ofrece muchas ventajas y pocos inconvenientes, los cuales, por otro lado, son fácilmente resueltos si se consigue vencer la inercia al cambio.