ISSN-0187/294X

BEB 92
BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

VOL. 11 No. 1, 2, 3 y 4 1992

EDITORIAL

INGREDIENTES PARA IMPARTIR UN "BUEN" CURSO DE BIOQUIMICA

Una de las aspiraciones de cualquier profesor es ofrecer buenos cursos. Cursos atractivos, motivantes, a los que el alumno desee asistir, esté atento, aprenda, participe y les recomiende a sus amigos y compañeros de la siguiente generación que se inscriban con ese profesor. Cursos que dejen satisfechos a los maestros por su puntualidad, por lo adecuado del programa, por la entusiasta participación de sus alumnos, por lo justo de las evaluaciones, por la sensación de agrado que percibe el profesor de parte de sus alumnos. En fin, a profesores y alumnos les sobran indicadores para calificar la calidad de los cursos en los que participan.

Al conversar con los alumnos recién egresados de algunas de las carreras universitarias, no es raro que se quejen de la mediocridad de los cursos a los que asistieron y sólo mencionen con manifiesto regocijo los cursos, y sobre todo los maestros, que dejaron huella. Añaden uno que otro curso que en su opinión fue pésimo. Me parece de enorme utilidad práctica el esbozar algunas características sobresalientes que en opinión de los alumnos, y de algunos maestros, habrán de estar presentes en un curso para considerarlo como bueno.

En los cursos participa el profesor, los alumnos y hay que aprender una asignatura. Idealmente se precisará un conjunto de objetivos que acoten lo que hay que aprender y la profundidad que se pretende alcanzar, así como el orden en el que se sugiere la presentación de los contenidos a los educandos: lo anterior son partes del programa. Los programas escrupulosamente desarrollados requieren de tiempo y experiencia por parte del equipo docente que los elabora. La extensión del

Pasa a la pág. 3

COMITE EDITORIAL

ALFONSO CARABEZ TREJO
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional

ALBERTO HAMABATA NISHIMUTA
Centro de Investigación y Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

CARLOS LARRALDE RANGEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

JESUS MANUEL LEON CAZARES
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

COORDINADOR EDITORIAL

YOLANDA SALDAÑA DE DELGADILLO
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR ASOCIADO

GUILLERMO ALVAREZ LLERA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

APOYO SECRETARIAL

ELISA MORA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE

BEB 92 Vol. 11 Núm. 1 Marzo de 1992

EDITORIAL

INGREDIENTES PARA IMPARTIR UN "BUEN" CURSO DE BIOQUIMICA
Enrique Piña Garza 1

ARTICULOS

PROTEÍNA CINASA C: MECANISMOS DE ACCION Y PERSPECTIVAS EN LA COMUNICACION CELULAR.
I. LA PROTEINA CINASA C COMO ELEMENTO CLAVE EN LOS SISTEMAS DE TRANSDUCCION HORMONAL
Martha Robles Flores 5

II. CARACTERISTICAS Y ACCION DE LA PROTEINA CINASA C EN LA PROPAGACIÓN DE LAS SEÑALES HORMONALES
Martha Robles Flores 12

BEB 92 Vol. 11 Núm 2 Junio de 1992

EDITORIAL

LA EVOLUCION DE LOS CONCEPTOS BASICOS EN LA BIOLOGIA DEL DESARROLLO.
Oscar Ramírez Toledado 22

ARTICULO

CARACTERISTICAS DE LAS MITOCONDRIAS DE PLACENTA HUMANA.
Ma. Teresa Espinosa-García, Federico Martínez y Oscar Flores Herrera 24

BEB 92 Vol. 11 Núm. 3 Septiembre 1992

EDITORIAL

¿HISTOLOGIA O BIOLOGIA CELULAR?
Alfonso Cárabez Trejo 28

ARTICULO

ALGUNOS ASPECTOS INTERESANTES DEL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LOS PARASITOS.
Leonor Fernández Rivera Río 29

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70,281, Coyoacán, C.P. 04510 México, D.F. Tiraje 2,000 ejemplares.

BEB 92 Vol. 11 Núm. 4 Diciembre 1992

EDITORIAL

EL FUTURO DEL BEB
Enrique Piña Garza 35

ARTICULOS

DAÑO CELULAR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL:
I. ASPECTOS FISIOLOGICOS, BIOQUIMICOS Y ESTRUCTURALES.
Alfredo Saavedra Molina 37

PANCREAS: BIOSINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES
II. Actividad de D5-3ß-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA.
Guillermo Mendoza, Federico Martínez y Juan Luis Rendón 42

OTRAS COMUNICACIONES

INTRODUCCION A LA FISIOLOGIA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES CELULARES.
Enrique Piña Garza 47

INDICE GENERAL 50

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA 52

Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.

Facultad de Medicina, UNAM

Viene de la pág. 1

INGREDIENTES...

programa se ajustará al tiempo disponible para la asignatura y es indispensable seleccionar los contenidos más relevantes y adecuados en función de la preparación previa de los alumnos y de las necesidades reales de aprendizaje en el desempeño de la actividad profesional. No se pretenderá preparar mini-especialistas.

En los cursos teórico-prácticos, como el de bioquímica, los ejercicios prácticos son de particularísima importancia, se requiere planear prácticas novedosas, demostrativas, que deberán conjuntar la sensación de un reto que vale la pena resolver, con la posibilidad real de que lo realice un buen alumno con las indicaciones adecuadas. La impresión entre los alumnos de que las prácticas de bioquímica son recetas de cocina venidas a menos es lacerantemente frecuente. Desde luego, el manual de prácticas es parte del programa, entonces, el primer ingrediente para un buen curso de bioquímica es preparar y disponer de un buen programa de bioquímica.

El segundo ingrediente es contar con buenas instalaciones y adecuados recursos para facilitar el aprendizaje. Un número razonable de alumnos, aulas acogedoras, bien iluminadas, buenos pizarrones, proyectores, diapositivas, acetatos, pero sobre todo bibliotecas adecuadas, actualizadas, con suficientes copias de textos y en donde dé gusto estar. En los

Pasa a la pág. 4

Viene de la pág. 3

INGREDIENTES...

cursos teórico-prácticos los laboratorios son críticos: espaciosos, equipados con las substancias y reactivos requeridos.

El tercer ingrediente para un buen curso lo constituyen los alumnos. ¿Cuál podría ser el retrato hablado de un buen alumno? Ramón y Cajal lo describe así: "Corazones generosos, poetas a ratos, románticos siempre, estos jóvenes distraídos poseen dos cualidades esenciales de que el maestro puede sacar gran partido: desdén por el lucro y las altas posiciones académicas y espíritu caballeresco enamorado de algunos ideales" ¡Bien por Don Santiago! No es posible enmendarle la plana, pero puede hacerse el intento de modernizarla. El alumno habrá de mostrar interés genuino en la asignatura, constancia en su estudio y participación crítica en el aula y el laboratorio. Lo demás es lo de menos. Para participar críticamente el alumno tiene que saber, sabe si estudia, y para estudiar requiere de interés en la asignatura. Es mejor frasearlo en sentido inverso: si el alumno tiene interés en la asignatura la estudiará, aprenderá y participará críticamente en las actividades docentes. Quiero hacer notar que la participación del buen alumno, para un buen curso, es eminentemente activa, corresponde a la respuesta ideal que los profesores esperamos de nuestros alumnos al "darles" la clase.

Y el cuarto ingrediente para un buen curso es un buen profesor. El alumno lo aprecia si es puntual, atento, respetuoso, si sabe su asignatura y reconoce sus limitaciones, si distribuye adecuadamente el tiempo para cubrir el programa completo, si atiende a sus alumnos, si se apega al programa de la asignatura, si resuelve objetivos y efectúa recapitulaciones oportunas, si es claro y justo en sus evaluaciones. Todo eso lo aprecia el alumno, pero creo que hay algo más. Intuitivamente el alumno aquilata en un nivel superior al maestro que lo interesa profundamente en su asignatura, que le muestra las bondades de la misma, que lo convence de invertir mucho tiempo degustándola, en comparación con el maestro que sólo le enseña la asignatura y lo obliga a que se la aprenda. El buen maestro es el que comunica su identificación con la asignatura de la que es profesor y muestra un atractivo camino para que el alumno la valore, la razone y en la medida que la encuentra agradable la entienda, la estudie, y la estudie por el gusto de saberla, no por la necesidad de aprobarla. El buen maestro es el que hace vibrar al alumno en la frecuencia de su asignatura. No es buen maestro quien sólo enseña, el bueno es el que forma.

Se pueden mencionar algunos requisitos para llegar a ser un buen maestro tal como lo delinié en los párrafos anteriores, pero carezco de la receta para describir lo que ha de hacer un profesor para garantizar que interesará a sus alumnos en su asignatura y los convencerá de su belleza y sus bondades. Estoy convencido de que ese buen profesor debe estar persuadido, en forma mínima de dos cosas: su asignatura es la más bonita y la más importante de todas las asignaturas en el mundo, y el tiempo más valioso de su vida profesional es el que dedica a sus alumnos.

Hago votos porque ofrezcamos a nuestros alumnos buenos cursos en el espíritu aquí anotado. Todos nos sentiremos mejor al cumplir más cabalmente la primera de nuestras obligaciones como universitarios.

Enrique Piña Garza
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México

PROTEINA CINASA C: MECANISMOS DE ACCION Y PERSPECTIVAS EN LA COMUNICACION CELULAR

I. La Proteína Cinasa C como elemento clave en los sistemas de transducción hormonal.

Martha Robles Flores. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Una de las características esenciales de los seres vivos es la de poder comunicarse con su medio ambiente. En la mayoría de los organismos superiores, existen dos sistemas principales de comunicación entre las células: el sistema hormonal o endócrino y el sistema nervioso. La interrelación entre estos dos sistemas es tan estrecha, que se puede considerar como uno solo: el sistema neuroendócrino. En ambos sistemas, las células se comunican unas con las otras por medio de mensajeros químicos.

En la forma de comunicación endócrina, una glándula libera hormonas que pueden actuar sobre células u órganos localizados en cualquier parte del organismo. Las glándulas endócrinas secretan hormonas al torrente sanguíneo; cada célula blanco está equipada con receptores, los cuales son proteínas capaces de reconocer específicamente a las moléculas de las hormonas destinadas a actuar en ella.

Las hormonas de naturaleza hidrofóbica, como los esteroides, tienen la facultad de atravesar la membrana celular y de poder unirse a receptores que se encuentran en el citoplasma. Sin embargo, la mayoría de las hormonas o mensajeros que se producen son de naturaleza hidrofílica (como péptidos, aminas y derivados de aminoácidos) y no atraviesan la membrana celular, sino que interaccionan con receptores localizados en el exterior de ella.

Los receptores de la superficie celular que se conocen hasta ahora se pueden clasificar en tres categorías distintas (1), de acuerdo con la topología que presentan en la membrana plasmática y de acuerdo con los mecanismos moleculares que emplean para transducir las señales: i) receptores acoplados a proteínas G, ii) receptores que poseen funciones catalíticas intrínsecas, ya sea de tirosina cinasa, de fosfotirosina fosfatasa, o de guanilato ciclasa y iii) receptores que operan canales iónicos.

El análisis estructural de la familia de receptores acoplados a proteínas G revela que todos ellos son glicoproteínas integrales de membrana que poseen una estructura con 7 dominios transmembranales unidos entre sí por asas intracelulares y extracelulares. Se cree que la unión del agonista (mensaje) con el receptor produce una conformación alterada tal, que el receptor activado es capaz de estimular a una proteína G. Las proteínas G que se acoplan a receptores de 7 dominios transmembranales, constituyen una familia altamente conservada de proteínas heterotriméricas compuestas por las subunidades α, β y γ (2) y funcionan modulando la afinidad del agonista por su receptor, acoplando esta interacción con los sistemas efectores. La interacción receptor-agonista induce el cambio de GDP unido a la subunidad α por GTP, provocando la disociación de GTP-α de los componentes

---

Abreviaturas: PKA, Proteína cinasa A; AMPc, Adenosin-3',5' monofosfato cíclico; DAG, 1,2-diacilglicerol; αF, α-forbol; IP_3, Inositol-1,4,5-trifosfato; PCh, Fosfatidilcolina; PC-PLC, Fosfatidilcolina-fosfolipasa C; PDBu, Forbol 12,13-dibutirato; PI, Fosfatidilinositol; PI-PLC, Fosfatidilinositol-fosfolipasa C (fosfoinositidasa); PIP_2, Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PKC, Proteína cinasa C; PLA_2, Fosfolipasa A_2; PLC, Fosfolipasa C; PLD, Fosfolipasa D; TPA, 12-0-tetradecanoil-forbol-13-acetato; 4-0-Me-TPA, 12-0-tetradecanoil-forbol-13-acetato 4-0-metiléter.

β, γ. Existe evidencia de que la subunidad activada GTP-α estimula entonces a la enzima efectora apropiada hasta que la subunidad α, por medio de su actividad intrínseca de GTPasa, hidroliza al GTP. Esto lleva a la formación de GDP-α y a su reasociación con β, γ, quedando la proteína G lista para volver a ser estimulada por la interacción agonista-receptor, mientras que la enzima efectora transmitirá la señal, convirtiendo a moléculas precursoras en segundos mensajeros en el proceso global que se conoce como transducción. Por último, los segundos mensajeros son reconocidos con una extraordinaria afinidad y especificidad por proteínas que participan en la propagación intracelular de la señal; éstas son las llamadas proteínas cinasas,las cuales fosforilan a algunas proteínas de la célula, que al ser fosforiladas, cambian en su actividad y activan o inhiben a su vez a otras proteínas cinasas y/o fosfatasas, desencadenando así una cascada de cambios que amplifican la señal en el interior de la célula.

En resumen, en el maravilloso escenario de la comunicación celular, nos encontramos con los siguientes protagonistas: los mensajeros, proteínas receptoras, proteínas G transductoras, proteínas efectoras del mensaje y por último, las proteínas cinasas amplificadoras, que propagan la señal para dar la respuesta final de la célula al mensaje inicial captado. En este escenario, son dos los sistemas de transducción de señales que mejor se conocen en la actualidad: el sistema de la adenilato ciclasa y el sistema de recambio de fosfolípidos con movilización de calcio. El presente artículo se centra en el estudio de una de las proteínas amplificadoras de señales hormonales más versátiles y trascendentales para la célula: la proteína cinasa C, enzima clave en el sistema de transducción de recambio de fosfolípidos y movilización de Ca^{2+}, por lo que a continuación se describirá detalladamente este sistema, después de una breve descripción del sistema de la adenilato ciclasa.

SISTEMA DE ADENILATO CICLASA

El segundo mensajero más conocido hoy en día es sin duda el AMP cíclico (AMPc), descubierto por el grupo del Dr. Sutherland en los años sesentas. Este compuesto es generado en fracción de segundos y en forma transitoria como resultado de la activación de la enzima adenilato ciclasa que forma al nucleótido cíclico a partir de ATP, generando también pirofosfato.

Si bien algunas hormonas como glucagon o vasopresina tienen la capacidad de estimular la actividad de la adenilato ciclasa, otras hormonas y neurotransmisores como la somatostatina y la acetilcolina, disminuyen los niveles de AMPc al inhibir a la enzima. También, algunas más como la epinefrina, son capaces de inducir ambas acciones a través de receptores diferentes. La activación o la inactivación de la adenilato ciclasa mediada por receptor, se lleva a cabo a través de proteínas transductoras Gs (estimuladora) y Gi (inhibidora), respectivamente. Estas proteínas sirven a su vez de sustrato a toxinas bacterianas. La toxina del cólera es capaz de ADP-ribosilar a la subunidad α de Gs en un residuo de arginina, bloqueando su actividad de GTPasa y dejándola entonces en forma permanente activa para estimular la producción de AMPc en las células (3). A su vez, la toxina pertussis ADP-ribosila a la subunidad α de Gi en un residuo de cisteína, bloqueando la actividad inhibidora que ejerce sobre la adenilato ciclasa (4).

En cuanto al elemento efector en este sistema de transducción de la adenilato ciclasa, se tiene evidencia de que existe en múltiples formas moleculares. La enzima purificada de corazón y de cerebro consta de una sola cadena polipeptídica con peso molecular aproximado de 150 kDa. Por lo menos una forma de la enzima de cerebro es activada por calmodulina, probablemente de manera directa, mientras que las otras formas de la enzima pueden ser activadas también directamente, pero de manera farmacológica, con el diterpeno forskolina.

Una vez formado el segundo mensajero por la adenilato ciclasa, el AMPc, es reconocido por la proteína cinasa A (PKA), enzima encargada de la propagación y amplificación de las señales acopladas a este sistema. La PKA está constituida por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas; la unión del AMPc a las subunidades reguladoras altera su afinidad por las subunidades catalíticas, provocando la disociación en un dímero de subunidades regula-

doras-AMPc y dos subunidades catalíticas libres, capaces de fosforilar a otras proteínas y de iniciar la propagación de la señal normal.

Existen evidencias de que hay una gran interacción entre los sistemas transductores acoplados a la adenilato ciclasa-PKA con los acoplados al recambio de fosfolípidos-activación de la proteína cinasa C (PKC). Esta interacción depende del tipo celular y puede resultar en un sinergismo, potenciando la formación de segundos mensajeros de un sistema o del otro, o bien, en un antagonismo, disminuyéndola. Los mecanismos moleculares implicados en esta intercomunicación se han dilucidado en algunos casos. Asi, se ha observado que los efectos de la PKC sobre el sistema de adenilato ciclasa son complejos y múltiples pudiendo afectarlo a nivel de cualquiera de sus componentes (Fig 1), ya sea por la fosforilación directa de ellos por PKC (5) o por la inducción de una alteración aún no bien definida molecularmente de alguno de ellos, como en el caso de Gs (6).

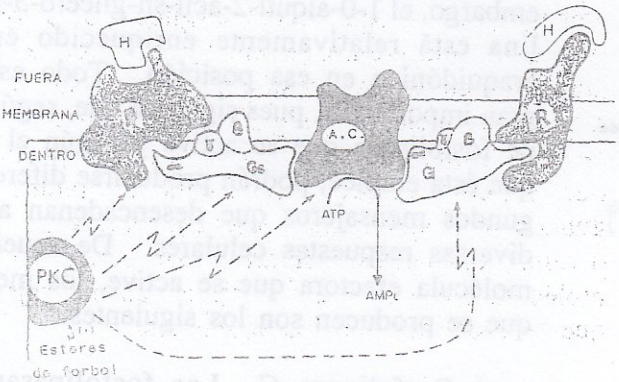

Figura 1. Modelo de la regulación del sistema de adenilato ciclasa por la proteína cinasa C. H, hormona o neurotransmisor; R, receptor; AC, adenilato ciclasa; Gs y Gi, proteínas G estimulatoria e inhibitoria, respectivamente; PKC, proteína cinasa C.

SISTEMA DE TRANSDUCCION DE RECAMBIO DE FOSFOLIPIDOS Y MOVILIZACIÓN DE CALCIO

La primera descripción que se hizo del calcio como mensajero intracelular fue en 1883 cuando el inglés Syney Ringer descubrió que el tejido muscular que estaba examinando no se contraía en ausencia del catión. Más tarde, Mabel y Lowell Hokin, observaron que la administración de acetilcolina a células secretoras pancreáticas aumentaba la incorporación de fosfato radiactivo a fosfatidilinositol, uno de los fosfolípidos constituyentes de la membrana celular. Sin embargo, no fue sino hasta 1975 en que Robert Michell percibió claramente una asociación estrecha entre el recambio del fosfatidilinositol (PI) y las variaciones en la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma de la célula, proponiendo que el mecanismo de transducción para un gran número de mensajeros involucra, como paso inicial, un aumento en el recambio de fosfoinositidos, el cual, a su vez, conduce a cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} (7). Desde 1975 hasta la fecha, el avance en el conocimiento sobre este tema ha sido enorme, y sigue evolucionando con gran rapidez. Los elementos que componen este sistema son 4: receptores, proteína Gp, fosfolipasas efectoras y la proteína cinasa C. La visión actual que se tiene de este sistema es la siguiente:

A) TRANSDUCCION DE LA SEÑAL

Los agonistas movilizadores de calcio incluyen a hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento que causan cambios profundos en el metabolismo celular de lípidos. Entre ellos se pueden citar: la epinefrina (vía receptores α1-adrenérgicos), vasopresina (receptores V1), histamina (receptores H1), serotonina (receptores 5HT2), angiotensina II (receptores AT1), α-trombina, tirotropina (TSH), hormona liberadora de tirotropina (TRH), α-interferon, interleucina 1, bradikinina, prolactina, bombesina y muchos más. Los cambios iniciados por estos agonistas al interaccionar con su receptor, conducen a la activación de una proteína fijadora de nucleótidos de guanina, la cual se ha llamado Gp (debido a que activa a una fosfolipasa), Gx (8) y, más recientemente, Gq (9).

Aunque la identidad de la proteína Gp o Gq empieza apenas a conocerse, el tratamiento con toxina pertussis ha indicado la existencia de por lo menos dos tipos de proteínas G en este sistema: en algunos tejidos y células, la proteína G que inhibe a la fosfolipasa C (una Gpi) parece ser sensible a la toxina (10), mientras que en otros, como las membranas de hígado bovino, la activación de fosfolipasa C (PLC) por dos proteínas

Gqα (Gps) es insensible al tratamiento con ella (8). Existe gran evidencia (10-12) que sugiere que existen distintos tipos de Gp que pueden acoplarse selectivamente tanto a diferentes receptores expresados en la misma célula, como a diferentes tipos de fosfolipasas efectoras.

Una vez activada la proteína Gp, se induce la activación de una fosfolipasa ya sea tipo C, D o A_2, la cual a partir de fosfolípidos precursores producirán los segundos mensajeros de la señal hormonal. Hasta hace poco tiempo, el esquema clásico de este sistema de transducción estaba representado exclusivamente por la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) por fosfolipasa C (PLC) mediada por receptor (Fig 2). Sin embargo, está muy claro actualmente que los agonistas movilizadores de Ca^{2+} pueden inducir también una hidrólisis rápida de fosfatidilcolina (PCh) a través de diferentes tipos de fosfolipasas.

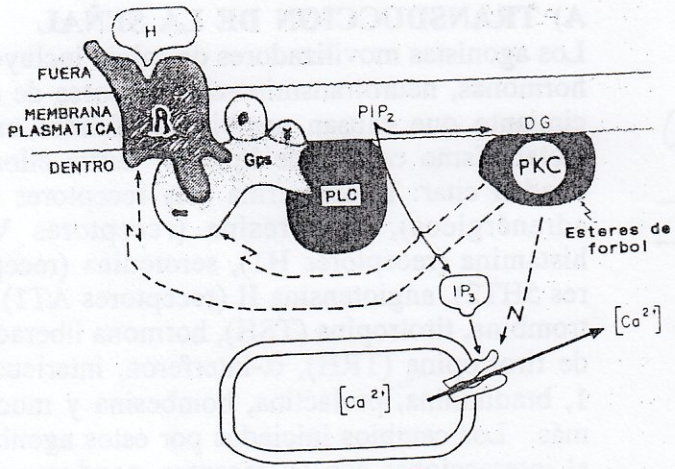

Figura 2. Modelo de regulación por retroalimentación ejercido por la proteína cinasa C sobre el sistema de transducción fosfoinositidos-calcio. H, hormona o neurotransmisor; R, receptor; PLC, fosfolipasa C (fosfoinositidasa); PIP_2, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; DG, diacilglicerol; IP_3, mio-inositol-1,4,5-trifosfato; GPs, proteína G estimulatoria aún no caracterizada; $[Ca^{2+}]$, concentración del ion calcio; PKC, proteína cinasa C.

Los fosfoinositidos son un pequeño grupo de fosfolípidos de membrana, únicos en cuanto a su cabeza polar de mio-inositol que puede ser fosforilada en varios sitios. Como la mayoría de los glicerolípidos, están constituidos por un esqueleto de sn-1,2-diacilglicerol, con la cabeza polar unida al átomo de carbono 3. Forman un componente menor de todas las membranas eucarióticas, pues colectivamente constituyen usualmente menos del 8% del total de lípidos de membrana (1).

La fosfatidilcolina, por el contrario, es el tipo de fosfolípido más abundante en los tejidos de mamífero y puede constituir hasta el 50% del contenido total de fosfolípido en la célula (3). Consiste de 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-0-alquil-2-acil-sn- glicero-3-fosfocolina y 1-alquil-1'-enil-2-acil-sn-glicero-3 fosfocolina. En la mayoría de los tejidos, la subclase dominante es el 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina (13). La PCh de tejidos de mamíferos normalmente contiene un ácido graso saturado en el carbono 1 (frecuentemente ácido mirístico) y un ácido graso insaturado en la posición del carbono 2 del glicerol. Comparado con los fosfoinosítidos, los cuales están relativamente enriquecidos en ácido esteárico y ácido araquidónico, el 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina, es relativamente enriquecido en ácido araquidónico y contiene principalmente ácido oleico o linoleico en la posición del carbono 2. Sin embargo, el 1-0-alquil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina está relativamente enriquecido en ácido araquidónico en esa posición. Todo esto tiene gran importancia, pues significa que, según el tipo de fosfolipasa que se active y según el sustrato que ésta emplee, podrán producirse diferentes segundos mensajeros que desencadenan a su vez diversas respuestas celulares. De acuerdo a la molécula efectora que se active, los mensajeros que se producen son los siguientes:

a) Fosfolipasa C.- Las fosfolipasas C son fosfodiesterasas que hidrolizan el enlace glicerofosfato de fosfolípidos intactos para generar diacilglicerol (DAG) y la cabeza polar soluble que lleva el grupo fosfato. La mayoría de las PLC que se han estudiado hasta ahora hidrolizan preferentemente al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2), pero se conoce también la existencia de otras PLC que no utilizan como sustrato al PIP_2 sino a la fosfatidilcolina (14).

Existen múltiples formas de PLC específicas para fosfoinosítidos, que, según su secuencia, se han clasificado en cuatro familias de isozimas α,

β, γ y δ (1) las cuales poseen distinto peso molecular y, sorpresivamente, aunque tres de ellas poseen dos estrechas regiones de secuencias homólogas, muestran muy poca homología global en su secuencia de aminoácidos. La hidrólisis del PIP_2 por fosfolipasa C (PI-PLC) genera dos segundos mensajeros: el DAG y el inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3).

El IP_3 tiene la capacidad de interactuar con receptores intracelulares localizados a nivel del retículo endoplásmico liso (15). La activación de estos receptores por este segundo mensajero induce la apertura de un canal que libera calcio de este organelo, aumentando de 3 a 10 veces la concentración de calcio citosólico, desde un valor de 100-200 nM hasta 600-1000 nM. Este incremento en la concentración de Ca^{2+} es un factor de acoplamiento muy importante, pues es capaz de activar a múltiples enzimas en forma directa y a proteínas cinasas dependientes del catión o del complejo Ca^{2+}-calmodulina. Además, el IP_3 puede ser fosforilado por una cinasa para la formación del inositol-1,3,4,5-tetrafosfato (IP_4). Se ha propuesto que tanto el IP_3 (15) como el IP_4 (16) pueden tener una función importante en la regulación de la entrada de calcio del exterior de la célula, necesaria para sostener respuestas por tiempo prolongado (más de 5 minutos). Se sabe que existe una interconversión rapidísima de los fosfoinosítidos, lo cual mantiene niveles más o menos constantes de ellos en la membrana plasmática de las células. Así mismo, el IP_3 es metabolizado hasta la obtención de inositol libre el cual es reciclado a fosfatidilinositol.

El otro segundo mensajero producido por la hidrólisis del PIP_2 o de la fosfatidilcolina (PCh), el diacilglicerol (DAG), es un compuesto hidrofóbico de aparición transitoria, ya que su desaparición se produce en segundos o minutos de su formación y activa a la PKC, como se describirá más adelante. Por su composición más variada, la hidrólisis de PCh por fosfolipasa C puede producir distintas especies moleculares de DAG (13), mientras que la hidrólisis de PIP_2 generealmente produce un solo tipo de DAG: el compuesto por 1-estearato y 2-araquidonato. La gran velocidad con que ocurre la degradación del DAG obedece a que es metabolizado a ácido fosfatídico (AP) por la DAG-cinasa o a 1-acil-glicerol y ácido graso libre por la DAG-lipasa, los que a su vez, pueden originar otros mensajeros.

b) Fosfolipasas A_2.- Son esterasas dependientes de Ca^{2+} que catalizan la hidrólisis de la posición 2-éster de los 3-sn-fosfoglicéridos. Se conoce bastante de la estructura de las PLA_2: constituidas por una sola cadena polipeptídica, poseen cerca de su extremo amino-terminal un patrón de residuos de cisteína repetido en tandem cuya secuencia y distribución es similar a la que se encuentra en el dominio regulatorio de las PKC; además, existe homología en la secuencia de aminoácidos entre la PKC y el sitio activo de las PLA_2, en posiciones análogas relativas al patrón de cisteína. De estas observaciones se ha hipotetizado que las PKC y las PLA_2, comparten elementos estructurales importantes para la interacción proteína-fosfolípido (18). En cambio, la información que se tiene sobre el papel de estas fosfolipasas en la transducción de señales que activan a la PKC es escasa en comparación con la que se tiene de las PLC y su estudio constituye en la actualidad un campo de investigación muy activo.

Se ha observado en distintos tipos celulares la activación de la PLA_2 mediada por receptor (14,19), así como su activación por distintas proteínas G (20). También se ha demostrado que las proteínas cinasas A,C y las tirosina cinasas, regulan la actividad de la PLA_2 celular (21).

La fosfolipasa A_2 hidroliza varios fosfolípidos de membrana incluyendo a fosfoinositidos, PCh y a la fosfatidiletanolamina (PE). La hidrólisis de PIP_2 o de PCh por esta fosfolipasa genera, por un lado, ácidos grasos insaturados: oleico, linoleico o araquidónico, que según se ha demostrado, estimulan a la proteína cinasa C en la presencia o ausencia de calcio y de fosfolípidos, y por otro lado, el lisofosfolípido correspondiente.

Cuando el ácido graso que se libera es el araquidónico, éste es convertido a través de las rutas de la ciclo-oxigenasa y de la lipo-oxigenasa a eicosanoides que incluyen a prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclinas, leucotrienos y lipoxinas (22). En algunas células, como en las Kupffer, se ha encontrado que la PLA_2 se transloca

rápidamente a las membranas de manera dependiente de Ca^{2+} para actuar como la suministradora principal de ácido araquidónico en estas células, y por tanto, como la enzima limitante en la síntesis de eicosanoides, muchos de los cuales son mediadores lipídicos potentes en los procesos de inflamación (23).

c) Fosfolipasa D.- Esta enzima hidroliza a fosfolípidos en el enlace existente entre el grupo de cabeza polar y el ácido fosfatídico. Investigación muy reciente ha revelado evidencias que sugieren que existe otra forma en la célula para generar DAG a partir de PCh involucrando la actividad de una fosfolipasa D (PLD) aparentemente a través de una proteína G (25,26). Los segundos mensajeros que se forman son colina y ácido fosfatídico (AP), y a partir de éste, por acción de la fosfatidil-fosfohidrolasa, se genera el DAG (25). Adicionalmente a la hidrólisis, la PLD cataliza una reacción única de transfosfatidilación por medio de la cual la porción fosfatidil del sustrato fosfolípido es transferida a alcoholes primarios para producir fosfatidilalcoholes (13). De hecho, esta reacción ha servido de apoyo adicional para demostrar que se activa la PLD en experimentos en los cuales los agonistas promueven la formación de fosfatidiletanol en la presencia de etanol (27).

Hasta el momento, se desconoce el papel que juega la colina liberada por la PLD o el de la fosfocolina producida por la PLC a partir de PCh; sin embargo, se ha propuesto que la síntesis de acetilcolina en el cerebro está acoplada a la hidrólisis de PCh (28). El ácido fosfatídico, cuya composición puede variar según el tipo de PCh que se hidrolice, puede constituir en si un mensajero potencial antes de ser degradado posteriormente a DAG (13).

La hidrólisis de PCh por PLD se observa frecuentemente después de un cierto período largo de estimulación con hormonas o con ésteres de forbol (activadores de la PKC). Hay evidencia que indica que algunos agonistas generan DAG de manera bifásica, a través de la estimulación secuencial de PLC y de PLD/PA hidrolasa probablemente para inducir una activación sostenida de la PKC, necesaria especialmente para producir las respuestas a largo plazo de ésta (29).

Finalmente, las conclusiones respecto a la manera en la cual es regulada la PLD varían. Algunos investigadores han inferido que la activación de PLD es dependiente de proteína cinasa C. Otros han atribuido la activación de PLD al aumento en el calcio citosólico inducido por agonistas (27).

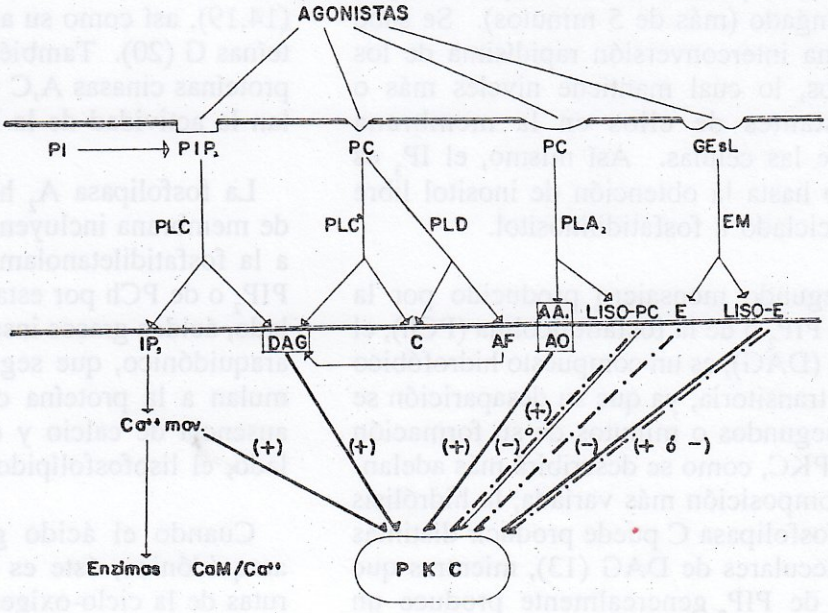

Figura 3. Mecanismos de activación e inhibición de la proteína cinasa C. PI, fosfatidilinositol; PIP_2, fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; PC fosfatidilcolina; GEsL, glucoesfingolípidos; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; PLA_2, fosfolipasa A_2, EM, esfingomelinasa; IP_3, inositol 1,4 5 trifosfato; DAG diacilglicerol; C, colina; AF, ácido fosfatídico; AA, ácido araquidónico; AO, ácido oleico; LISO-PC, lisofosfatidil colina; E, esfingosina y LISO-E, lisoesfingosina.

En la figura 3 se encuentra esquematizado un resumen de los segundos mensajeros que se pueden generar en este sistema de transducción de señales, indicando las enzimas efectoras que los producen y la modulación positiva o negativa que ejercen sobre la PKC. Los fenómenos que se han reseñado en este capítulo, han sido objeto de un estudio intenso en los últimos años, y aunque no se han esclarecido muchas preguntas, se está progresando en forma espectacular en este campo, por lo que seguramente en los próximos años se tendrá la respuesta a muchas de ellas.

REFERENCIAS

1. Meldrum E, Parker P J y Carozzi A. (1991) Biochim Biophys Acta *1092*: 49.
2. Birnbaumer L, Abramowitz J y Brown AM. (1990) Biochim Biophys Acta *1031*: 163.
3. Holmgren J. (1981) Nature *292*: 413.
4. García-Sáinz J A. (1985) Ciencia *36*: 97.
5. Yoshimasa T, Sibley DR, Bouvier M, Lefkowitz RJ, y Caron M G. (1987) Cell *48*: 913.
6. Hernández-Sotomayor SMT, Macías-Silva M, Plebañski M y García-Sáinz JA. (1988) Biochim Biophys Acta *972*: 311.
7. Michell RH. (1985) Biochim Biophys Acta *415*: 81.
8. Gilman AG. (1987) Ann Rev Biochem: *56*: 615.
9. Blank JL, Ross AH y Exton, JH. (1991) J Biol Chem *266*: 18206.
10. Bizzarri C, Di Girolamo M, D'Orazio MC y Corda D. (1990) Proc Natl Acad Sci USA *87*: 4889.
11. Brass LF, Shaller CC y Belmonte E J. (1987) J Clin Invest *79*: 1269.
12. Rubin RP, Withiam-Leitch M y Laychock SG. (1991) Biochem Biophys Res Commun *177*: 22.
13. Billah MM y Anthes JC. (1990) Biochem J *269*: 281.
14. Daniel KW, Waite M y Wykle R. (1986) J Biol Chem *261*: (20): 9128.
15. Spat A, Bradford PG, McKinney JS, Rubin RP, y Putney JWJr. (1986) Nature *319*: 514.
16. Burgess GM, Bird GSt.J, Obie JF y Putney JW Jr. (1991) J Biol Chem *266* (8): 4772.
17. Irvine RF y Moor RM. (1986) Biochem J *240*: 917.
18. Maraganore JM. (1987) TIBS *12*: 176.
19. Weiss BA y Insel PA. (1991) J Biol Chem *266* (4): 2126.
20. Burch RM, Luini A y Axelrod J. (1986) Proc Natl Acad Sci USA *83*: 7201.
21. Pernas P, Masliah J, Olivier JL, Salvat C, Rybkine T y Bereziat G. (1991) Biochem Biophys Res Commun *178* (3): 1298.
22. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR y Lefkowitz, J.B. (1986) Ann Rev Biochem. *55*: 69.
23. Krause H, Dieter P, Sculze-Specking A, Ballhorn A y Decker K. (1991) Eur J Biochem *199*: 355.
24. Kolesnick RN y Clegg S. (1988) J Biol Chem *263* (14): 6534.
25. Cabot MC, Welsh CJ, Cao H y Chabbott H. (1988) FEBS Lett *233* (1): 153.
26. Bocckino SB, Blackmore PF, Wilson PB y Exton JH. (1987) J Biol Chem *262*: 15309.
27. Huang R, Kucera GL, y Rittenhouse SE. (1991) J Biol Chem *266* (25): 1652.
28. Loffelholz K. (1989) Biochem Pharmacol *38*: 1543.
29. Van Blitterswijk WJ, Hilkmann H de Widt J. y Vander Bend RL. (1991) J Biol Chem *266* (16): 1037.

PROTEINA CINASA C: MECANISMOS DE ACCION Y PERSPECTIVAS EN LA COMUNICACION CELULAR

II. Características y acción de la proteína cinasa C en la propagación de las señales hormonales.

Martha Robles Flores. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Los trabajos de Krebs, Fischer y Larner en los años 1955-70, llevaron al descubrimiento de la regulación enzimática por fosforilación reversible, cuando demostraron que el control neurohormonal del metabolismo del glucógeno en músculo esquelético estaba mediado por cambios en el estado de fosforilación de las enzimas glucógeno fosforilasa, fosforilasa cinasa y glucógeno sintasa. Estas 3 enzimas fueron los únicos ejemplos de este fenómeno hasta finales de 1960, cuando se descubrió a la proteína cinasa A, dependiente de AMPc (1). En los últimos 10 años, se ha visto un enorme avance en esta área, especialmente con el advenimiento de las técnicas de clonación molecular, así como con el descubrimiento de que muchos oncogenes codifican para proteínas cinasas. Actualmente asciende a más de 100 el número de proteínas cinasas descritas y seguramente se descubrirán más, ya que se ha calculado que el genoma de los mamíferos puede codificar hasta para mil diferentes proteínas cinasas (2).

Todas las proteínas cinasas caracterizadas hasta ahora, caen en una de dos grandes clases: las específicas para fosforilar residuos de serina y treonina, y las específicas para fosforilar residuos de tirosina. A pesar de esta diferencia, existe entre todas ellas una gran homología en sus dominios catalíticos, pues la comparación de las secuencias primarias de un gran número de ellas, ha revelado la existencia de tres regiones altamente conservadas que constituyen el sitio de unión para el ATP: son las secuencias **Gly-X-Gly-X-X-Gly, X-Ala-Val/Ile-Lys-X,** y dentro de una región de 60 aminoácidos, caracteristicamente espaciados, los tripletes **Arg-Asp-Leu, Asp-Phe-Gly y Ala-Pro-Glu** (2).

El proceso de fosforilación y desfosforilación de proteínas catalizada por proteínas cinasas y por proteínas fosfatasas, está reconocido como uno de los medios principales a través del cual se regulan las funciones celulares. Entre los que están regidos por este proceso, son los siguientes: a) transducción de señales hormonales, b) regulación de rutas metabólicas, c) regulación de la síntesis de proteínas, d) organización del citoesqueleto, e) regulación de la transcripción, f) neurotransmisión y g) regulación de apertura o cierre de canales iónicos.

La fosforilación múltiple es un mecanismo sencillo para ampliar grandemente el potencial regulatorio de las enzimas: la fosforilación en un sitio puede amplificar, o bien, antagonizar los efectos de la fosforilación en otros sitios, o puede alterar las velocidades a las cuales son fosforilados o desfosforilados éstos. La fosforilación en distintos sitios por diferentes proteínas cinasas, capacita a las enzimas para responder a varios estímulos fisiológicos, ya que las interacciones entre los sitios de fosforilación pueden representar el mecanismo por el cual un estímulo influye en otro. Los sustratos, activadores o inhibidores, pueden también afectar la velocidad a la cual es fosforilada o desfosforilada una enzima, amplificando o suprimiento los efectos de la modificación covalente. La fosforilación-desfosforilación por eso no debe considerarse como un mecanismo de "apagado o encendido" de una enzima, sino más bien como una forma de cambiar a esta proteína en dos o varias formas, que respondan diferencialmente a sustratos y a moléculas reguladoras, lo que ofrece posibilidades de un control finísimo para integrar la información extra e intracelular y producir la respuesta precisa.

CARACTERES ESTRUCTURALES DE LA PROTEINA CINASA C.

Desde su descubrimiento en 1977 por el grupo de Yasutomi Nishizuka, la PKC se ha convertido en el foco de atención de investigadores interesados en el estudio de los mecanismos de transducción de señales, de diferenciación celular y de tumorigénesis.

Los estudios de clonación molecular, así como los análisis bioquímicos, han revelado que la PKC existe como una familia de múltiples subespecies con estructuras estrechamente relacionadas entre sí. Hasta el día de hoy, se han identificado 8 subespecies de PKC: α, βI, βII, γ, δ, ε, ξ y η (3). Las subespecies βI y βII derivan de un solo gen, que se transcribe en dos RNAm distintos por procesamiento alterno; difieren una de otra aproximadamente en 50 residuos de aminoácidos localizados en la región V5 de sus extremo carboxilo. Todas las subespecies de PKC poseen diferencias en su modo de activación, propiedades cinéticas y especificidad de sustrato (4,5) y pueden ser subdivididas en dos grupos (3): las dependientes de Ca^{2+} (α, β y γ) y las independientes de Ca^{2+} (δ, ε, ξ y η). Ambos grupos de proteínas consisten de una sola cadena polipeptídica con una estructura homóloga general: 3 o 4 regiones altamente conservadas y 5 regiones variables distribuídas en dos dominios, uno regulatorio y otro catalítico, separados entre si por la región variable V3, como se muestra en la figura 1.

La mitad amino terminal contiene las regio constantes C1 y C2 y constituye el domi regulatorio, que interacciona con Ca^{2+}, fosfolíp y DAG o ésteres de forbol. Cabe hacer notar a que solamente los dominios regulatorios de isozimas α, β y γ contienen la región C2, mient que en las demás subespecies está ausente.

En el extremo amino de la región C1 se local el motivo denominado "pseudosustrato", ide ficado por primera vez por House y Kemp 1987 (5). Se trata de una pequeña secuen aminoácida cuyo motivo central RKGALR po una gran afinidad por el sitio activo de la PKC, que se parece al sitio de fosforilación de sustratos de la enzima al tener una secuencia **G Ala** flanqueada por residuos básicos, determin tes para el reconocimiento del sitio a fosfori por la PKC. De hecho, un péptido sintético c contiene la secuencia pseudosustrato actúa co potente inhibidor de PKC, mientras que la su tución de **Ala** por **Ser** en esta secuencia, tranforma en un excelente sustrato para la enzi (4,5). Esto llevó a proponer a House y Kemp q el sitio pseudosustrato puede interaccionar con sitio activo de PKC en las células para mante inactiva a la cinasa en ausencia de activadores (

La región constante C1 contiene además, u repetición en tandem de la secuenica rica cisteína-Cys-X2-Cys-X13(14)-Cys-X2-Cys-X Cys-X7-Cys, donde X representa cualqui

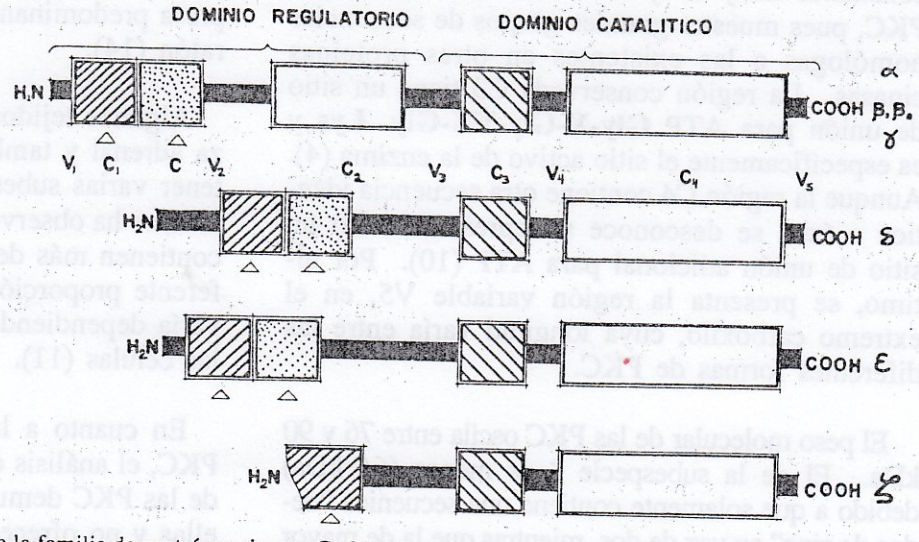

Figura 1. Estructura de la familia de proteínas cinasas C. C1 a C4, regiones constantes 1 a 4; V1 a V5, regiones variables 1 a 5; Δ, regi donde se localizan las secuencias ricas en cisteína "dedos de zinc".

aminoácido (6). Esta secuencia es conservada en todos los miembros de la familia de PKC, con la excepción de que en PKC ξ no está repetida (7), y es similar a la secuencia consenso de "zinc-DNA-binding-finger" (dedos de zinc) presente en muchas metaloproteínas y en proteínas que se unen al DNA y que están relacionadas con la regulación de la transcripción de éste (8), aunque en el caso de la PKC, no hay evidencia sólida que indique que se une a DNA.

La región conservada C2, de 115 residuos de aminoácidos que sigue a la región V2, es idéntica en un 67% en los tipos α, β y γ, y más del 65% de las diferencias entre ellos representan cambios conserva-tivos. Se ha demostrado que esta región lleva el sitio de unión para calcio, el cual no posee una estructura típica "brazo EF" (α hélice-asa-α hélice) presente en la mayoría de las proteínas que unen Ca^{2+} (4).

Inmediatamente adyacente a la región C2 se localiza la región V3, que es la más extensa y la de mayor divergencia entre todas las 5 regiones variables de PKC. Esta región posee características hidrofílicas y se cree que representa una zona expuesta de las PKC pues es muy sensible al ataque proteolítico. Parker *et al* han propuesto que representa una región bisagra entre los dominios catalítico y regulatorio (6,9). La mitad carboxilo terminal de cada isozima, que empieza después de la región hipervariable V3, contiene las regiones constantes C3 y C4 y es el dominio catalítico de PKC, pues muestra grandes grupos de secuencias homólogas a las existentes en otras proteínas cinasas. La región conservada C3 tiene un sitio de unión para ATP **Gly-X-Gly-XX-Gly...Lys** y es específicamente el sitio activo de la enzima (4). Aunque la región C4 contiene otra secuencia idéntica a ésta, se desconoce si representa o no un sitio de unión adicional para ATP (10). Por último, se presenta la región variable V5, en el extremo carboxilo, cuya longitud varía entre las diferentes formas de PKC.

El peso molecular de las PKC oscila entre 76 y 90 kDa. El de la subespecie ξ es menor (64 kDa) debido a que solamente contiene una secuenica "dedos de zinc" en vez de dos, mientras que la de mayor peso molecular es la subespecie ε, de 90 kDa (4).

LOCALIZACION DE LA PKC

La localización genética de los miembros de la familia de PKC se ha establecido solamente para las subespecies dependientes de calcio. El gen de PKC α se localiza en el cromosoma humano 17, el de PKC β en el cromosoma 16 y el de PKC en e cromosoma 19.

El uso de técnicas tales como la hibridación *in situ* con mRNA y el análisis Northern con sondas oligonucleotídicas específicas, ha sugerido que algunas isozimas de PKC se expresan específicamente en ciertos tejidos (10). El patrón de expresión de múltiples especies de PKC se ha examinado también usando técnicas bioquímicas, citoquímicas e inmunológicas con anticuerpos específicos para cada subespecie. Mucho se conoce acerca de la distribución de α, β y γ y poco de la de δ, ε, ξ y η.

La subespecie α es la que se encuentra más ampliamente distribuída. Las PKC con las secuencias βI y βII están presentes en proporción variable en muchos tejidos y tipos celulares incluyendo el cerebro. En la rata, la subespecie γ se expresa únicamente en el cerebro y en la médula espinal. En cuanto a la localización de las isoformas independientes de calcio, se ha reportado que PKC δ es la forma principal que se expresa en tejido hematopoyético de ratón (11), que PKC ε se expresa en células de pituitaria, cerebro y timo de rata (12), PKC ξ en cerebro, plaquetas y neutrófilos (13), y por último, que PKC η se expresa predominantemente en pulmón y en piel de ratón (14).

Algunos tejidos como corazón, pulmón, corteza adrenal y también las plaquetas, parecen contener varias subespecies aún no definidas. Además, se ha observado que la mayoría de las células contienen más de una subespecie de PKC en diferente proporción, cuya distribución intracelular varía dependiendo del estado de proliferación de las células (11).

En cuanto a la localización intracelular de la PKC, el análisis de las características hidropáticas de las PKC demuestra una similitud general entre ellas y no ofrece pistas adicionales respecto a su posible localización; solamente la región repetida

rica en cisteína contiene grupos pequeños de secuencias hidrofóbicas, que pueden permitir, con una conformación apropiadamente plegada, la asociación de la PKC con el lado citoplásmico de la membrana plasmática (9). Se ha reportado que la isoforma βI frecuentemente está asociada con la membrana plasmática, mientras que la βII se localiza en el aparato de Golgi (4). También se ha reportado la localización de PKC β en núcleo (15), así como su translocación desde el citosol hasta el núcleo en varios sistemas humanos y en hígado de rata (16,17). Sin embargo, se desconoce en la actualidad la topografía intracelular precisa de las subespecies de la proteína cinasa C.

ACTIVACION DE LA PKC

Para entender el mecanismo de acción de la PKC se requiere conocer el proceso de su activación. La base molecular de este proceso dista mucho de ser clara en el presente. No obstante, se tiene conocimiento de varios aspectos de este fenómeno, que se describirán a continuación.

Los moduladores endógenos naturales positivos por excelencia de la PKC son el sn-1,2-diacilglicerol, fosfolípidos ácidos, particularmente la fosfatidilserina y, en el caso de las isoformas α, β y γ, también el calcio. Como ya se describió en el artículo anterior, existen varias rutas que proveen el DAG necesario para la activación de la enzima, mientras que la movilización de calcio resulta solamente de la liberación de IP_3 por la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2).

Entre varios fosfolípidos probados (18), sólo los de carácter ácido de cadena larga, además de la fosfatidilserina (PS), tales como el fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y el ácido fosfatídico (AP), han sido efectivos para producir la activación de PKC, en diferentes grados y a concentraciones de calcio relativamente altas (10^{-4} - 10^{-3}M), pero ninguno ha sido más potente que la PS para activar a cualquiera de las isoformas de la PKC. Sin embargo, varios fosfolípidos de membrana, que son inactivos por sí mismos, juegan un papel específico con cooperatividad positiva o negativa en la activación de PKC. Así, se ha visto que cuando PS es suplementada con PE, se produce mayor activación de la enzima; inversamente, la adición de fosfatidilcolina o de esfingomielina, disminuye notablemente la activación inducida por PS (18).

Recientemente se ha visto que la lisofosfatidilcolina y otros lisofosfolípidos regulan la actividad de la PKC de una manera bifásica; la estimulan a baja concentración (<20 μM), y la inhiben a altas concentraciones (30 μM) (36), sugiriendo que pueden funcionar como moduladores tanto negativos como positivos de la PKC.

Se sabe también que aunque tanto el DAG como la colina requieren de calcio para sus efectos, la lisofosfatidilcolina disminuye la afinidad de la proteína cinasa C por el Ca^{2+}, mientras que el DAG la aumenta.

Por otro lado, la dependencia *in vitro* de PKC por Ca^{2+}, DAG y fosfolípido, varía marcadamente con el aceptor de fosfato utilizado (19). Se ha observado que en ausencia de Ca^{2+}, las propiedades cinéticas de la PKC son influídas grandemente por la basicidad de las proteínas sustrato implicadas (20), pues ciertos policationes favorecen la expresión del sitio de unión para DAG, estabilizando la conformación activa de PKC, aunque el mecanismo preciso para inducir actividad de PKC se desconoce (21).

Se ha sugerido que la activación de la enzima por fosfolípidos causa un cambio conformacional en la PKC que desplaza la secuencia pseudosustrato del sitio activo, permitiendo asi el acceso a él de los sustratos proteicos (21), como se observa en las figuras 2a y 2b. La inhibición ejercida por el pseudosustrato no tiene efecto sobre la dependencia de la PKC en cuanto a la presencia de PS, DAG o Ca^{2+}.

La proteína cinasa C puede ser activada también por proteólisis limitada con proteasas neutras dependientes de calcio, calpaina I o calpaina II. La hidrólisis ocurre en uno o dos sitios específicos de la región V3, liberándose el fragmento catalítico, que es completamente activo en ausencia total de Ca^{2+}, DAG y fosfolípido y se le denomina proteína cinasa M. Se sabe que la PKC asociada a membrana es más susceptible a este tipo de proteólisis (22) y que diferentes

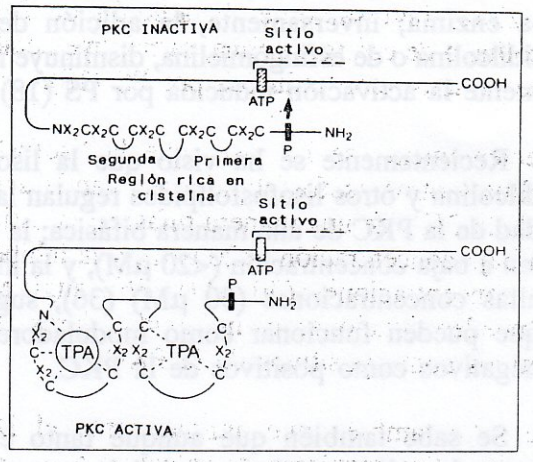

Figura 2a. Modelo de activación de la PKC por TPA. Se propone que la formación de asas como consecuencia de la unión del TPA, desplaza el sitio pseudosustrato (P) del sitio activo. La segunda región rica en cisteína que contiene un residuo de Asn, puede unir al TPA con mayor afinidad (simbolizada por un círculo) que la primera región. C, cisteína; N, asparagina.

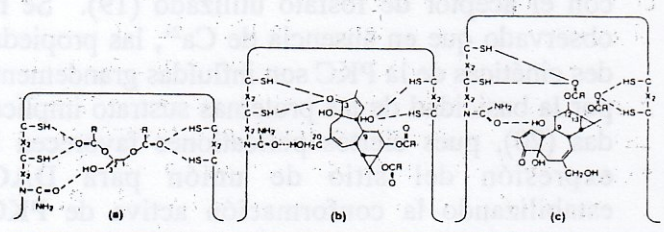

Figura 2b. Unión propuesta del diacilglicerol (a) y del éster de forbol TPA (b y c) a la segunda región rica en cisteína de la PKC. C-SH, cisteína; N-CO-NH2, asparagina; R, ácido graso.

subespecies de PKC son hidrolizadas a distintas velocidades. Aunque el significado fisiológico de esta proteólisis limitada no ha sido establecido, es posible que esta reacción constituya una manera de activar a PKC persistentemente. Alternativamente, la proteólisis puede ser también un medio de iniciar la degradación de la molécula de PKC, denomina "down-regulation" (4).

Existe evidencia (23) de que las formas α, βI, βII, γ y η de PKC pueden autofosforilarse en la presencia de calcio (o en su ausencia, en el caso de PKC n), PS y dioleína *in vitro* y, aunque se ha asociado con la activación de la enzima, su significado fisológico se desconoce.

La PKC sirve también como receptor para promotores de tumores: los ésteres de forbol. Estos compuestos diterpénicos, tal como el tetradecanoil-forbol-acetato (TPA) obtenido de la semilla del árbol *Croton tiglium* tienen una estructura similar a la del diacilglicerol (Fig 3); se intercalan rápidamente en la membrana activando directamente a la PKC tanto *in vitro* como *in vivo*. Como el DAG, los ésteres de forbol aumentan dramáticamente la afinidad de la enzima por calcio. Sin embargo, estos diterpenos no son rápidamente metabolizados y pueden extender una fase de la respuesta celular usualmente limitada.

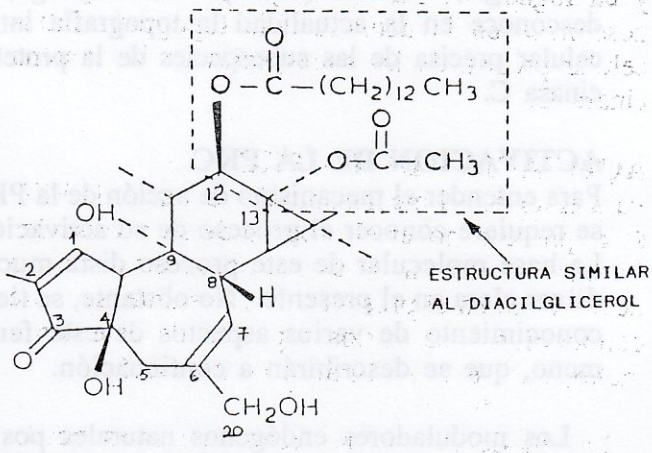

Figura 3. Estructura del potente promotor de tumores tetradecanoil-forbol-acetato (TPA).

Por otro lado, la translocación (redistribución) de la PKC entre los compartimentos solubles y asociado a membranas parece estar involucrada en la activación de la enzima (24-26), en la "down-regulation" (degradación) de la PKC (27,28) y en el acceso a sustratos específicos. Se tiene abundante evidencia de que el Ca^{2+} aumenta la afinidad de la cinasa por las membranas promoviendo su asociación reversible con ellas, mientras que los ésteres de forbol, potencian este efecto y producen la asociación no reversible de la PKC a las membranas.

Además de los ésteres de forbol y diterpenos relacionados, se han identificado otros productos naturales estructuralmente distintos que también se unen a PKC con alta afinidad: estos comprenden a los indol-alcaloides tales como teleocidina y los poliacetatos tales como aplisiatoxina (29). También las briostatinas, que son lactonas macrocíclicas aisladas de *Bugula neritica* y de otros briozoarios marinos, activan farmacológicamente a la PKC (29).

La PKC se activa cuando un diglicérido se une a un sitio efector de su dominio regulador; esta interacción es estereoespecífica, siendo activo solamente el (S)-enantiómero. Los estudios de especificidad han mostrado un grado no usual de especificidad hacia el esqueleto del glicerol y a las mitades hidrofílicas de los diglicéridos. La especificidad estricta mostrada hacia éstos, contrasta con la conducta de PKC hacia promotres de tumores estructuralemte tan diversos.

En 1989, usando mutantes con deleciones y mutaciones en la región C1 de PKC, Ono *et al* (30) demostraron que la secuencia "dedos de zinc" es indispensable para la unón del éster de forbol a la enzima. Por esto, se ha pensado que es posible que el TPA, y tal vez el DAG, se unan por puentes de hidrógeno a los grupos sulfhidrilo de estas regiones ricas en cisteína. El DAG exhibe solamente dos grupos aceptores (éster carbonilo) y un grupo donador (el grupo OH libre) y entonces sólo se puede unir a PKC en una orientación, como lo indica la figura 2b. El TPA, sin embargo, contiene dos regiones con grupos aceptores y donadores disponibles. Una es la región C3, C9 y C20 y otra es la región C9, C12 y C13.

Varios autores (29, 31, 32) han realizado estudios de la interacción de los activadores con la PKC usando comparaciones computarizadas de las estructuras derivadas de rayos X o de las calculadas, para dilucidar los elementos críticos que constituyen el farmacóforo de los ésteres de forbol y del DAG, a fin de contestar la pregunta de que cómo el mismo sitio de unión puede ser el blanco de moléculas activadoras tan diferentes. Todos estos autores, han coincidido en proponer un modelo estereoquímico en el cual el carbonilo del C3 y los hidroxilos del C9 y C20 del TPA, son los esenciales para la unión con la PKC (Fig 2b) y corresponden a ciertos oxígenos y nitrógenos en otros compuestos. La estructura tipo DAG del TPA es intrigante, pero puede no ser significativa puesto que existen otros activadores de PKC que no contienen una zona tipo DAG.

Por tanto, la interacción de la PKC con las 3 zonas hidrofílicas indicadas, es vista como la *sine qua non* de la activación de la enzima, aunque adicionalmente se requiere también de zonas hidrofóbicas espacialmente correspondientes (32): se sabe que las cadenas de ácido graso esterificadas a los C13 oC12, son importantes para la actividad de los ésteres de forbol, pues los de cadenas cortas son menos potentes que el TPA, por lo que se cree que estas regiones hidrofóbicas pueden estar involucradas en la interacción con fosfolípido, que es absolutamente requerida para activar completamente a la PKC (7).

El efecto del DAG como activador de la PKC, asi como su afinidad por ella, es al menos 3 órdenes de magnitud menores que la de TPA. Esto puede ser debido a que el farmacóforo C3, C9, C20 del TPA se ajusta mejor en la región rica en cisteína, que el farmacóforo C1, C2, C3 del DAG (7).

Este modelo está apoyado por evidencia experimental adicional: el residuo de asparagina presente solamente en la segunda región dedos de zinc de la PKC, puede ser esencial para una fuerte unión del TPA, puesto que permitiría un puente de hidrógeno adicional con el grupo OH del C20 (Fig 2b). Consistente con esto, el grupo de Ono (13) ha encontrado que la PKC ξ, que contiene sólo la primera región rica en cisteina (sin asparagina), no es activada por concentraciones nanomolares de TPA.

Existen diferencias entre las diversas subespecies de proteína cinasa C en cuanto a su modo de activación (33). Por ejemplo, una de las características más sobresalientes de las isozima γ es que puede ser activada *in vitro* por concentraciones micromolares de ácido araquidónico libre y por algunos de sus metabolitos tales como lipoxina A; esta activación no requiere de Ca^{2+} ni de fosfolípido. En contraste, las subespecies β son activadas muy pobremente por concentraciones micromolares de ácido araquidónico, mientras que las especies α responden a altas concentraciones de él, pero sólo a elevadas concentraciones de calcio (10).

Las subespecies δ, ε y η son activadas muy fuerte por TPA (13). Existe evidencia de que en plaquetas, que co-expresan los subtipos α, β y ξ, el TPA en concentración micromolar transloca diferencialmente a estas isozimas (3). También, en células HL60, la briostatina y el forbol dibutirato difieren en su habi-

lidad de activar y de translocar a las subespecies α y βII: PKC α es translocada a la membrana plasmática en respuesta a briostatina, mientras que ßII se transloca a la membrana nuclear en respuesta al éster de forbol (34).

Actualmente, existe muy poca información sobre las consecuencias bioquímicas y fisiológicas de la activación de más de un tipo de PKC. Tampoco se conoce con precisión la especificidad de sustrato *in vivo* de todas la isoformas de PKC. Por otro lado, como ya se dijo antes, la dependencia de PKC sobre Ca^{2+}, DAG y fosfolípido varía con el aceptor de fosfato usado en las reacciones *in vitro*, lo que sólo ha hecho posible la comparación entre los miembros de la familia de PKC bajo condiciones limitadas. Es posible que las distintas subespecies de PKC respondan diferencialmente a activadores *in vivo*, pero el problema recién mencionado, junto con el hecho de que las preferencias de sustrato y de activadores puedan ser el resultado de la distribución diferencial en varios tipos celulares así como de la compartamentalización dentro de la misma célula, deja en el presente importantes preguntas por contestar en cuanto a los mecanismos de activación *in vivo* de cada isozima de PKC.

SUSTRATOS DE PKC

Las proteínas que son capaces de servir de sustrato a la proteína cinasa C normalmente contienen aminoácidos básicos en el lado carboxilo terminal adyacente al residuo de serina o treonina a ser fosforilado (35).

La razón por la cual un sustrato puede influir el requerimiento de cofactores para PKC se desconoce, y tampoco está claro si tiene significado fisiológico. De acuerdo a esto, los sustratos se han clasificado en tres categorías: A) aquellos cuya fosforilación no requiere de cofactores, como la protamina, B) sustratos como la proteína mielina básica, poli-**Lys-Ser** o poli-**Arg-Ser**. que requieren solamente de la presencia de fosfolípido y C) sustratos como histona, troponina y la cadena ligera de la miosina, que requieren la presencia de Ca^{2+} y de fosfolípido (19).

Hasta el día de hoy, se ha reportado una gran cantidad de sustratos para PKC. Sin embargo, no se sabe si todos ellos son sustratos fisiológicos. Se han encontrado en múltiples sistemas celulares, dos proteínas que se fosforilan por la activación de PKC *in vivo*: una es la glicoproteína ácida de 80 kDa (36) y la otra es la proteína denominada MARCKS (sustrato de cinasa C rico en alanina, miristoilado), utilizados frecuentemente como índice de la activación de PKC (37); pero aunque estas proteínas se han caracterizado a nivel molecular, su función precisa es obscura, así como también el tipo de PKC que las fosforila. Entre los demás sustratos que se conocen para PKC están los siguientes (7, 38, 39):

a) Proteínas receptoras: receptores α1 y β-adrenérgicos, receptor para factor de crecimiento epidérmico, receptor de insulina (la treonina 1336 de la subunidad β), receptor de transferrina, receptor de somatomedina C (IGF-I), receptor de interleucina 2, receptor colinérgico nicotínico y receptor de IP_3.

b) Proteínas membranales: ATPasa de calcio de la membrana plasmática, ATPasa Na^+/K^+, canal de Na^+, intercambiador Na^+/H^+, transportador de glucosa y proteínas G.

c) Proteínas contráctiles y del citoesqueleto: cadena ligera y pesada de la miosina, troponinas I y T, vinculina, filamina y proteínas asociadas a microtúbulos.

d) Enzimas: glucógeno fosforilasa cinasa, glucógeno sintasa, fosfofructocinasa, β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA reductasa, tirosina hidroxilasa, NADPH-oxidasa, citocromo P450, guanilato ciclasa, adenilato ciclasa, fosfolipasas C, DNA-metilasa y factor de iniciación 2.

e) Otras proteínas: Topoisomerasa II, proteínas no histónicas HMG 14 y 17, histonas H1, H2B yH4, proteína ribosomal 6S, fibrinógeno, protrombina, GABA modulina, fosfolamban, proteína mielina básica (MBO), lamininas A y B y lipocortinas.

INHIBIDORES DE PKC

Existen varios moduladores negativos endógenos de PKC. Hannun y Bell (40), descubrieron que la esfingosina derivada de la hidrólisis de gluco-

esfingolípidos de membrana por acción de la esfingomielinasa, es un inhibidor potente y reversible de la actividad de PKC. Las características estructurales críticas de la esfingosina como inhibidor, son la amina primaria y el carácter hidrofóbico. También los lisoesfingolípidos inhiben reversiblemente y con gran potencia a PKC. Sin embargo, los inhibidores endógenos más potentes que se han reportado hasta el momento, son proteínas que unen calcio: una de 17 kDa aislada de hígado de rata y de otros tejidos (41), y otras proteínas de 29-33 kDa que tienen similitud en la región carboxilo terminal con la familia de las lipocortinas (42).

Otros inhibidores de la proteína cinasa C que han sido reportados incluyen: dibucaína, clorpromazina, adriamicina, verapamil, amilorida, tamoxifeno, bilirrubina, palmitoilcarnitina, derivados isoquinolinasulfonamida (H7), polimixina B, staurosporina (43), gossypol, tioésteres ácido graso acil-CoA, sangivamicina, y derivados de acridina (43).

Se sabe que H7, staurosporina y sangivamicina, actúan como inhibidores competitivos con respecto al ATP y que los derivados de acridina se comportan como inhibidores no competitivos también con respecto al ATP. Los polisacáridos sulfatados tales como pentosán polisulfato (PPS) y heparina, son otros potentes inhibidores de la PKC: PPS es inhibidor competitivo con respecto al ATP y no competitivo con respecto a histona; en contraste, la heparina inhibe a la PKC competitivamente con respecto al sustrato proteico y no competitivamente con respecto al ATP (44). A excepción de estos inhibi-dores, existe muy poca información sobre los mecanismos de acción por los cuales los demás compuestos mencionados afectan la actividad de la PKC, lo que ha llevado a suponer que la mayoría de estas moléculas perturban la bicapa lipídica, inhibiendo como consecuencia a la PKC no específicamente (43).

FUNCIONES DE LA PKC

Una de las principales funciones de la proteína cinasa C es la de regular tanto positiva como negativamente la interacción de ciertos receptores de la membrana con componentes del aparato celular de transducción de señales. Cuando el control que ejerce es positivo, ocurre una potenciación de la respuesta que se produce al estímulo dado, pero puede ejercer también un control negativo de "feedback" sobre varios pasos en los procesos de transmisión de señales, produciendo entonces diferentes tipos de desensibilización, es decir, respuestas disminuidas a estímulos subsecuentes en el sistema bajo control. Por ejemplo, en hepatocitos de rata, la activación de PKC conduce a la inactivación de la glucógeno sintasa (45), al bloqueo de las acciones α1-adrenérgicas por fosforilación del receptor α1-adrenérgico (38), a la desensibilización heteróloga de adenilato ciclasa por la inhibición de las acciones de Gs (46) y al bloqueo de la función de Gi a través de la fosforilaicón de αGi (47).

Todas las formas de acción ejercidas por la PKC pueden operar tanto a corto como a largo plazo. Entre los diversos procesos celulares que modula la PKC produciendo respuestas rápidas, están los siguientes (39):

- En sistemas endócrinos, secreción de aldosterona, prolactina, catecolaminas, insulina, hormona de crecimiento, calcitonina, hormona luteinizante, tirotropina, hormona paratiroidea y hormonas pituitarias.

-En sistemas exócrinos, secreción de amilasa, mucina, pepsinógenos, ácido gástrico y surfactante.

-En el sistema nervioso, liberación de acetilcolina, dopamina y de otros neurotransmisores.

-En sistemas musculares, contracción y relajación de músculo liso.

-En sistema inmune, liberación de histamina, de serotonina y de enzimas lisosomales; síntesis de eicosanoides, agregación plaquetaria y activación de linfocitos T y B.

-Otros sistemas y procesos metabólicos: lipogénesis en adipocitos, esteroidogénesis.

-Transporte de iones a través de la membrana: regula la acción de la ATPasa de calcio de la membrana plasmática, de la ATPasa de Na^+/K^+,

del canal de Na^+, del intercambiador Na^+/H^+ y del transportador de glucosa.

Dentro de las respuestas a largo plazo moduladas por la activación de la proteína cinasa C están la síntesis del DNA y la regulación de la expresión de ciertos genes como el que codifica para γ interferón (48), interleucina 2 (49), la ornitina-descarboxilasa (50), calcitonina (51), prolactina (52) y de los proto-oncogenes **c-myc, c-fos** y **c-jun** (53). También, la fosforilación de proteínas catalizada por PKC ejerce profundos efectos en los procesos de proliferación celular, desarrollo y diferenciación (49, 54).

En fin, la versatilidad bioquímica, así como la importancia que tiene esta cinasa para inducir gran variedad de respuestas celulares es realmente sorprendente. La diversidad de funciones en las cuales se ha involucrado a la PKC, puede estar relacionada con la capacidad de activar múltiples especies moleculares de ella, aunque en la actualidad, como se ha reiterado, existe muy poca información sobre este aspecto. Como puede observarse, aunque aparentemente el avance en el conocimiento de la proteína cinasa C ha sido grande, quedan aún muchas preguntas por contestar y apenas nos estamos asomando al entendimiento de los profundos efectos que ejerce esta cinasa en el procesamiento y modulación de muchas respuestas fisiológicas y patológicas a señales externas.

REFERENCIAS

1. Cohen P, (1982) Nature *296*: 613.
2. Hunter T, (1987) Cell *50*: 823.
3. Crabos M, Imber R, Woodtli T, Fabbro D y Erne P, (1991) Biochem Biophys Res Commun *178* (3): 878.
4. Farago A, y Nishizuka Y. (1990) FEBS Lett. *268* (2): 350.
5. House C y Kemp B. (1987) Science *238*: 1726.
6. Parker P J, Coussens L, Totty N, Rhee L, Young S, Chen E, Stabel S, Waterfield M D y Ullrich A. (1986) Science *233*: 853.
7. Gschwendt M, Kittstein W y Marks F. (1991) TIBS *16*: 167.
8. Berg J. (1986) Science *232*: 485.
9. Coussens L, Parker P J, Rhee L, Yang-Feng T L, Chen E, Waterfield M D, Francke U y Ullrich A. (1986) Science *233*: 859.
10. Nizhizuka Y. (1988) Nature *334*: 661.
11. Mischak H, Bodenteich A, Kolch W, Goodnight J,Hofer F y Mushinski J F. (1991) Biochemistry *30*: 7925.
12. Schaap D y Parker P J. (1990) J Biol Chem *265* (13): 7301.
13. Ono Y, Fujil T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K y Nishizuka Y. (1989) Proc Natl Acad Sci. USA *86*: 3099.
14. Osada S, Mizuno K, Saido T C, Akita Y, Suzuki K, Kuroki T y Ohno S. (1990) J Biol Chem *265* (36): 22434.
15. Huang K P, Zwiller J, Vincendon C, Malviya A N, Rogue P, Labourdette G, Masmoudi A, Yoshida Y y Huang F L. (1990) J Biol Chem *265* (97): 4161.
16. Deli E, Kiss Z y Kuo J F. (1988) FEBS Lett. *231* (2): 407.
17. Chiarugi V, Magnelli L, Pasquali F, Vannucchi S, Bruni P, Quattrone A, Basi G, Capaccioli S y Ruggiero M.(1990) Biochem Biophys Res Commun *173* (2): 528.
18. Kaibuchi K, Takai Y y Nishizuka Y. (1981) J Biol Chem *256* (14): 7146.
19. Bazzi M D y Nelsestuen G I. (1987) Biochemistry *26*: 1974.
20. Kuroda T, Mikawa K, Mishima H y Kishimoto A. (1991) J Biochem *110*: 364.
21. Thompson N T, Bonser R W, Hodson H F y Garland G. (1988) Biochem J *255*: 417.
22. Kishimoto A. (1983) J Biol Chem *258*: 1156.

23. Huang K P, Nakabayashi H y Huang F L. (1986) Proc Natl Acad Sci USA *83*: 8535.

24. Kraft A S y Anderson W B. (1983) Nature *301*: 621.

25. Hirota K, Hirota T, Aguilera G y Catt K J. (1985) J Biol Chem *260*: 3243.

26. Naor Z, Zer J, Zakut H y Hermon J. (1985) Proc Natl Acad Sci USA *82*: 8203.

27. Melloni E, Pontremoli S, Michetti M, Sacco O, Sparatore B y Horecker B C. (1986) J Biol Chem *261*: 4101.

28. Ballester R y Rosen O. (1985) J Biol Chem *260*: 15194.

29. Wender P A, Cribbs C M, Koehler K, Sharkey N, Herald Ch L, Kamano Y, Pettit G R y Blumberg P M. (1988) Proc Natl Acad Sci USA *85*: 7197.

30. Ono Y, Fujil T, Igarashi K, Kuno T, Tanaka Ch, Kikkawa U y Nishizuka Y. (1989) Proc Natl Acad Sci USA *86*: 4868.

31 Leli U, Hauser G y Froimowitz M. (1990) Mol Pharmacol *37*: 286.

32. Nakamura H, Kishi Y, Pajares M A y Rando R R. (1989) Proc Natl Acad Sci USA *86*: 9672.

33. Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K y Nishizuka Y. (1988) J Biol Chem *263* (14): 6927.

34. Hocevar B A y Fields A P. (1991) J Biol Chem *266* (1): 28.

35. Woodgett J R, Gould K L y Hunter T. (1986) Eur J Biochem *161*: 177.

36. Erusalimsky J E, Brooks S F, Herget T, Morris C y Rozengurt E. (1991) J Biol Chem *266* (11): 7073.

37. Seykora J T, Raveth J V y Aderem A. (1991) Proc Natl Acad Sci USA *88*: 2505.

38. Sibley D R, Benovic J L, Caron M G y Lefkowitz R. (1987) Cell *48*: 913.

39. Nishizuka Y. (1986) Science *233*: 305.

40. Hannun Y A y Bell R M. (1987) Science *235*: 670.

41. McDonald J R, Gröschel-Stewart U y Walsh M P. (1987) Biochem J *242*: 695.

42. Toker A, Ellis C A, Sellers L A y Aitken A. (1990) Eur J Biochem *191*: 421.

43. Hannun Y A y Bell R M. (1988) J Biol Chem *262* (11): 5124.

44. Herbert J M y Maffrand J P. (1991) Biochim Biophys Acta *1091*: 432.

45. Roach P J y Goldman M. (1983) Proc Natl Acad Sci USA *80*: 7170.

46. Hernández-Sotomayor S M T, Macías Silva M, Plebañski M y García-Sáinz J A. (1988) Biochim Biophys Acta *972*: 311.

47. Bushfield M, Pyne N J y Houslay M D. (1990) Eur J Biochem. *192*: 537.

48. Wilkinson M y Morris A. (1983) Biochem Biophys Res Commun. *111*: 498.

49. Masmoudi A, Labourdette G, Mersel M, Huang F L, Huang K P, Vincendon G y Malviya A. (1989) J Biol Chem *264* (2): 1172.

50. Otani S, Matsui I, Kuramoto A y Marisawa S. (1985) Eur J Biochem *147*: 27.

51. Degen J L, Estrarsen R D, Nagamine Y y Ruch E. (1985) J Biol Chem *260*: 12426.

52. Johnson K M, Vassallo T y Torres B A. (1985) J Immunol *134*: 967.

53. Larsson L-G, Ivhed I, Gidlun M, Pettersson U, Vennstrom B y Nilsson K. (1988) Proc Natl Acad Sci USA *85*: 2638.

54. Otte A P, Koster C H, Snoek G T y Durston A J. (1988) Nature *334*: 618.

EDITORIAL

LA EVOLUCION DE LOS CONCEPTOS BASICOS EN LA BIOLOGIA DEL DESARROLLO

Pocas disciplinas han llegado a tener el auge que hoy disfruta internacionalmente la Biología del Desarrollo.

Por su propia naturaleza interdisciplinaria, esta vieja heredera de las ideas Aristotélicas del siglo IV A.C., que conformaron al binomio epigenismo-preformismo, ha devenido en una ciencia robusta y de frontera en las naciones con fuerte tradición científica. Para muestra basta citar algunos títulos contemporáneos de *symposia*, conferencias y seminarios de organizaciones académicas de gran prestigio: a) Linajes celulares en el desarrollo (1990), *symposium* en el cual se exploran ideas que abarcan desde las bases genéticas de la determinación y del compromiso tisular, hasta la identificación morfológica de la expresión genética específica del tejido; b) Mecanismos ontogenéticos y filogenéticos de la neuro-inmunodulación (1992), conferencia que enfatiza las interacciones contínuas entre los sistemas nervioso, endócrino e inmune y que abarcan desde la Biología Molecular hasta las Ciencias Psicosociales. Ambos eventos fueron auspiciados por la Academia de Ciencias de Nueva York y celebradas en los Estados Unidos e Italia, respectivamente.

De manera regular, diversas sociedades locales e internacionales del área biológica celebran sus congresos en los que, en forma creciente, se incluyen tópicos de diferenciación, morfogénesis y desarrollo de los diversos organismos de los reinos de la naturaleza. Difícilmente puede ignorarse que hay conocimientos generados en los laboratorios de ciencias básicas de la disciplina, que pueden ser incorporados a los aspectos pragmáticos de las ciencias y de las artes aplicadas. La germinación sincrónica de semillas de trigo pre-hidratadas, el transplante de tejidos cultivados, epitelial y nervioso, en quemaduras de piel o en enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (SNC), son ejemplos recientes de la interacción básica aplicada de las ciencias del desarrollo.

En relación al desarrollo y su complejidad, varias personalidades contemporáneas de la Biología han aportado sus conceptos para lograr un consenso en la definición. Por ejemplo Jacob y Monod (1963) en forma críptica, pero sin duda cierta, establecen que "una célula está diferenciada con respecto a su vecina, si ambas sintetizan patrones de proteínas distintos, aunque posean el mismo genoma". Esto es válido para todas las especies. De esa manera, la definción incluye aspectos de estructura y de vías metabólicas reguladas por enzimas. Así, estos autores afirman que "la diferenciación celular controla el tiempo de emergencia, la forma, el número de células y su organización en tejidos y órganos especializados".

Pasa a la pág. 23

Viene de la pág. 22

LA EVOLUCION...

Durante el *Symposium* sobre la Diferenciación, auspiciado por la Fundación CIBA en 1967, los expertos acordaron restringir el término diferenciación sólamente cuando una célula dada tiene la opción de producir en su progenie a dos linajes distintos: por ejemplo, una célula del mesénquina puede producir el linaje condrogénico y el linaje muscular. Una vez establecido un linaje durante los pasos sucesivos de su maduración, el proceso diferenciativo entre cada estadio recibirá el nombre de modulación. Se propuso además que ésta cayese dentro del dominio de la Biología Celular y saliese del dominio de la del Desarrollo.

En otra perspectiva, Dientsman y Holtzer (1975) cuestionan el concepto de la existencia de células indiferenciadas y supuestamente totipotenciales (que pueden dar lugar a un organismo completo) ¡ni aún el cigoto!. Su proposición con bases experimentales en la diferenciación de los linajes eritrogénico, condrogénico, miogénico y fibrogénico, establece que no hay substancias inductoras primarias (caracterizadas físico-quimicamente), determinantes en la canalización del desarrollo. La objeción básica radica en la incapacidad de células totipotenciales para responder a la acción de inductores químicos específicos (epigenismo).

Por el contrario, la capacidad de respuesta a los inductores está limitada a un estadio restringido en la historia del sistema reaccionante (preformismo específico de especie). No hay respuesta antes o después de ese período, lo que implica la existencia de un estadio competente y diferenciado para ese estadio del sistema reaccionante celular y/o tisular.

Como puede verse, este punto de vista genera polémica con los epigenistas, desde los clásicos de la Escuela Alemana de Roux y Spemann, laureado éste con el Premio Nobel en la década de 1930, así como sus seguidores contemporáneos (Born y col, 1986), hasta los biólogos que hacen uso de los medios condicionados para inducir histogénesis específica en cultivos de tejidos (Königsberg, 1963; Ramírez y Alemán, 1986).

Sin embargo, es de resaltarse que los términos están planteados desde el siglo IV A C, con Aristóteles, es apenas a la mitad de este siglo XX que se empezó a vislumbrar que epigenismo y preformismo no son procesos excluyentes. Pueden concurrir a veces en secuencia y otras simultaneamente, en el establecimiento de las estirpes celulares y tisulares de los organismos.

Oscar Ramírez Toledano
Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y
Estudios Avanzados,
Instituto Politécnico Nacional

CARACTERISTICAS DE LAS MITOCONDRIAS DE PLACENTA HUMANA

Ma. Teresa Espinosa-García, Federico Martínez y Oscar Flores-Herrera. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-159, Coyoacán 04510, México D F, México.

RESUMEN

Las mitocondrias de placenta humana presentan características que las hacen diferentes a las descritas en las mitocondrias de hígado o de corazón, por ejemplo: contienen una elevada concentración de colesterol; presentan una cadena de transporte de electrones asociada al citocromo P-450 involucrada en la síntesis de progesterona. Muestran una ATPasa diferente a la F_1F_0 y una ADPasa fuertemente unida a la membrana cuyo papel fisiológico se desconoce, pero que pudieran estar involucradas en el mecanismo de transferencia del colesterol para la síntesis de progesterona o en la regulación de la actividad del citocromo P-450.

PALABRAS CLAVE: Placenta, Mitocondrias, Respiración, Progesterona, Metabolismo mitocondrial

INTRODUCCION

La placenta humana es un órgano transitorio que permite mantener la relación materno-fetal durante el embarazo. Realiza varias funciones como el transporte de metabolitos y oxígeno, así como funciones endócrinas esenciales (1) para el desarrollo fetal. Se conoce poco acerca de los mecanismos que regulan las funciones endócrinas, sin embargo se ha reportado que de las hormonas esteroidales la más importante es la progesterona por su participación en el mantenimiento del embarazo, ya que su ausencia induce el aborto (1).

En la placenta, la progesterona se sintetiza en la fracción mitocondrial, lo que sugiere que las funciones metabólicas de este organúlo pueden ser diferentes a las reportadas para otras mitocondrias no esteroidogénicas. En este trabajo se describen algunas de las características que hacen de las mitocondrias de la placenta humana un sistema mitocondrial distinto a los descritos para mitocondrias no esteroidogénicas.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.

Las mitocondrias aisladas de placenta humana muestran varios tipos morfológicos cuando se observan al microscopio electrónico; el primer tipo corresponde a mitocondrias redondas, similares a las del hígado de rata, con crestas bien definidas y con una matriz que presenta una densidad electrónica media. El segundo tipo son mitocondrias de forma ancha y angulosa con membranas tortuosas que forman vacuolas de diferentes tamaños, con pocas crestas y una matriz electrodensa (2). Estos tipos característicos se han observado en las preparaciones obtenidas en nuestro laboratorio, las cuales presentan un buen control respiratorio (entre 4 y 6 con succinato como sustrato), cuando se comparan con los valores reportados en la literatura (de 2.5 a 3.5).

COMPOSICION LIPIDICA DE LAS MEMBRANAS.

Las membranas de las mitocondrias de la placenta están formadas en mayor proporción (3) por fosfatidilcolina (44 %), y en menor proporción por esfingomielina (22 a 30 %), fosfatidiletanolamina (21 %) y fosfatidilinositol y fosfatidilserina (12 %); además tiene un alto contenido de colesterol (30 μg/mg de proteína) en comparación con las mitocondrias de otros tejidos (3 a 5 μg/mg de proteína). Esta composición las hace semejantes a las membranas plasmáticas y a la membrana del retículo endoplásmico; lo que les confiere características diferentes a las encontradas en las membranas mitocondriales de hígado o de corazón de rata. Por otro lado se ha demostrado que la composición lipídica de las mitocondrias de

tejidos tumorales es parecida a la descrita para las de placenta y aunque hasta el momento no hay estudios comparativos, varios datos de la literatura sugieren que las características funcionales de las mitocondrias de la placenta se podrían explicar con base en la composición de su membrana.

SINTESIS DE PROGESTERONA.

Las mitocondrias de la placenta contienen al menos dos sistemas de transporte de electrones, uno de estos es la cadena respiratoria clásica, semejante a la descrita en otros tejidos, que se acopla a la síntesis de ATP a través de un gradiente de protones. La segunda cadena está constituida por una flavoproteína, una ferrosulfoproteína y un citocromo P-450$_{scc}$, la cual está relacionada con la síntesis de pregnenolona; los equivalentes reducidos los recibe del NADPH, no genera un gradiente de H^+ y tiene como aceptor final al oxígeno molecular. El otro sustrato para esta cadena es el colesterol, proveniente del citosol, cuya incorporación en la mitocondria se podría realizar por un sistema transmembranal similar al propuesto para las mitocondrias de las glándulas suprarrenales.

El colesterol (C_{27}) se transforma en pregnenolona (C_{21}) por dos hidroxilaciones consecutivas en carbones adyacentes, a través del citocromo P450$_{scc}$ y la oxidación de dos moléculas de NADPH, para formar el intermediario 20,22 dihidroxi colesterol. El paso siguiente es la escisión de la cadena lateral con la oxidación de otra molécula de NADPH, así se obtiene el isocaproaldehido y la pregnenolona; esta última es transformada en progesterona, a través del complejo *DELTA*-isomerasa 3-β esteroide deshidrogenasa, la cual sale de la mitocondria para llegar al torrente circulatorio materno y fetal (4).

CADENA RESPIRATORIA.

Desde el punto de vista metabólico la mayoría de los estudios realizados en las mitocondrias de la placenta se han interesado en el mecanismo de la síntesis de progesterona y pocos se han enfocado al estudio de la fosforilación oxidativa; los resultado muestran que las mitocondrias de placenta llevan a cabo las reacciones clásicas de la fosforilación oxidativa identificadas en las mitocondrias de otros tejidos. La cadena de transporte de electrones de estas mitocondrias se ha caracterizado con inhibidores específicos como la rotenona, la antimicina y el cianuro, en presencia de diferentes sustratos (5). La cuantificación de los citocromos mitocondriales de placenta indica que sus concentraciones son similares a las observadas en otros tejidos esteroideos, pero menores que en las mitocondrias de hígado o corazón de rata (6). Esta cadena recibe equivalentes reductores provenientes del NADH, así como los generados por el succinato, glicerol 3-fosfato y por sustratos artificiales como el ascorbato combinado con el TMPD. A diferencia de otras mitocondrias los sustratos NAD^+ dependientes estimulan en menor proporción el consumo de oxígeno en comparación con los sustratos que producen $FADH_2$. Se ha observado que el 20% de la respiración generada por el glutamato es insensible a los inhibidores de la cadena respiratoria y se ha propuesto que este consumo de oxígeno procede de la vía asociada al citocromo P450$_{scc}$ (5).

La cadena respiratoria clásica en estas mitocondrias incluye los tres sitios de acoplamiento y conservación de energía para la formación de ATP, y la adición de ADP induce la transición del estado 4 al estado 3, con controles respiratorios que van desde 2.5 hasta 6 con glutamato y malato como sustratos. La relación ADP/O está cercana al máximo teórico (7); sin embargo la velocidad de respiración difiere de la descrita para las mitocondrias de hígado o de corazón, que es más lenta para las de placenta, por lo que se ha sugerido que las enzimas de la cadena respiratoria tienen actividades bajas. Se han descrito características similares para el translocador de los adenín nucleótidos (8) y para la F_1F_0-ATPasa (9). Cuando se determina la actividad de estas proteínas en las mitocondrias íntegras, la actividad es baja; sin embargo, al ser parcialmente purificadas presentan velocidades semejantes a las reportadas para otros tejidos. Una posible explicación a este comportamiento se puede atribuir a la composición lipídica de su membrana, ya que el elevado contenido de colesterol puede modificar su fluidez e impedir el funcionamiento óptimo de las enzimas embebidas en ella.

MECANISMOS DE REGULACION DEL METABOLISMO MITOCONDRIAL.

Con respecto a la regulación de las funciones mitocondriales de placenta, se ha demostrado en preparaciones parcialmente puras que la ATPasa

de mitocondrias de placenta presenta características semejantes a la F_1 del hígado de rata, incluso en la sensibilidad a la temperatura, la especificidad al sustrato, requerimiento de cationes divalentes, insensibilidad a la oligomicina y su modulación por ATP, bicarbonato y magnesio libre (9), por lo que se ha sugerido que no es la actividad de la ATPasa la responsable del bajo consumo de oxígeno que muestran las mitocondrias de la placenta, sino que responde a otros factores de regulación intrínsecos a estas mitocondrias.

Se ha propuesto también que la respiración en las mitocondrias de la placenta es baja por el elevado contenido de hormonas esteroides, ya que se ha descrito que la progesterona puede inhibir la respiración en mitocondrias de tejidos no esteroidogénicos (10).

Por otro lado, se ha sugerido que la concentración de los adenín nucleótidos en estas mitocondrias podría regular la fosforilación oxidativa; sin embargo, el contenido de adenín nucleótidos es similar al encontrado en las mitocondrias de hígado de rata fetal (2 a 3 nmoles/mg), pero menores que las descritas para las mitocondrias de hígado de rata adulta, resultando difícil explicar el bajo consumo de oxígeno por este parámetro.

Otro modulador de la actividad enzimática que se debe considerar es el calcio, el cual se encuentra en altas concentraciones en estas mitocondrias (60 nmoles/mg de proteína mitocondrial). Se ha descrito que este catión contribuye a la regulación de varias enzimas mitocondriales, como las deshidrogenasas, la ATPasa, el translocador de los adenín nucleótidos, etc (8).

Varios reportes señalan que la adición de los metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs, a las preparaciones de mitocondrias de placenta humana, estimulan el consumo de oxígeno, la síntesis de ATP y la síntesis de progesterona. Aunque se oxidan preferencialmente el isocitrato, el citrato, y el cis-aconitato; esta se ve favorecida por la presencia de malato, fumarato y succinato probablemente por la transformación de estos tres últimos en oxaloacetato o piruvato, alimentadores del ciclo de Krebs. De estos resultados se ha sugerido que los sistemas transportadores de los ácidos tri y dicarboxílicos se encuentran presentes, al igual que las enzimas del ciclo de Krebs.

La oxidación preferencial del isocitrato se ha explicado por la presencia de dos isocitrato deshidrogenasas (11), una dependiente del NAD^+ y otra del $NADP^+$, con una actividad siete veces más alta para esta última que para la dependiente del NAD^+. Se ha descrito que en estas mitocondrias el citrato se puede sintetizar a partir del malato a través de la malato deshidrogenasa y de la enzima málica, las cuales forman oxaloacetato y piruvato respectivamente, y que se metabolizan en el ciclo de Krebs para dar citrato.

Prácticamente todos los intermediarios del ciclo de Krebs, además del glutamato y del glicerol 3-fosfato, estimulan la síntesis de progesterona a partir del colesterol tanto endógeno como exógeno. Como se ha mencionado, las hidroxilaciones sobre los esteroles tienen un requerimiento específico del NADPH y debido a que este nucleótido no puede atravesar la membrana interna mitocondrial, su principal fuente de reducción está limitada a sustratos como malato e isocitrato, a través de la isocitrato deshidrogenasa dependiente del $NADP^+$, a la enzima málica y la vía de la transhidrogenasa, que cataliza la reducción del $NADP^+$ por el NADH y requiere de la energía almacenada en el gradiente electroquímico de protones. En estos trabajos se mostró que el ADP y el ATP pueden estimular la síntesis de progesterona inducida por malato o por otros substratos que pueden derivarse hacia este metabolito, por ejemplo el fumarato y el succinato. Esta estimulación se atribuye a la actividad de la enzima málica, que sería la principal fuente generadora de NADPH para las funciones de oxidasas múltiples (12).

Finalmente, las mitocondrias de la placenta poseen un metabolismo especial para los adenín nucleótidos. Hemos observado la presencia de una ATPasa y una ADPasa que están firmemente unidas a la mitocondria, cuyo papel fisiológico se desconoce. De manera comparativa, se ha demostrado, en mitocondrias de glándulas suprarrenales, la presencia de una GTPasa que está íntimamente ligada al mecanismo de transporte de colesterol del citoplasma hacia la mitocondria (13). Por otro lado, se ha propuesto que la actividad del

citocromo P450 se podría regular a través de un mecanismo de fosforilación-desfosforilación, en el cual participaría una enzima que utiliza ATP como sustrato de la fosforilación. Aunque actualmente desconocemos la función fisiológica de estas enzimas, es probable que puedan estar ligadas a los mecanismos de regulación, tanto de la transferencia de colesterol para la síntesis de progesterona, como en la regulación de la actividad del citocromo P450.

REFERENCIAS

1. Wiener, M y Friedlander, R. (1971) Abnormal progesterone synthesis in placental tissue from a spontaneous abortion. Am. J. Obstet. Gynecol. *111:* 942-946.

2. Klimek, J, Aleksandrowicz, Z, Wrzolkowa, T y Zelewski, L. (1972) The oxidative phosphorylation and electron-microscopic structure of mitochondria isolated fron human term placenta. Biochem. Med. *6:* 426-437.

3. Chakraborti, A S, Biswas, R, Majumdar, R y Mukherjea, M. (1980) Relationship between mitochondrial ATPase and lipids from developing human placenta. Gynecol. Obstet. Inves. *11:* 294-300.

4. Hall, P F. (1986) Cytochrome P-450 and the regulation of steroid synthesis. Steroids *48* (3/4): 131-196.

5. Olivera, A A. y Meigs, R A. (1975) Mitochondria from human term placenta. II. Characterization of respiratory and coupling mechanisms. Biochim. Biophys. Acta *376:* 436-445.

6. Negrie, Ch, Triadou, N, Michel, O, Bouhnik, J y Michel, R. (1979) Oxidative phosphorylation reactions and cholesterol hydroxylation mechanisms in humnan term placental mitochondria. J. Steroid Biochem. *11:* 1135-1140.

7. Zolnierowicz, J, Swierczynski, J y Zelewski, L. (1982) Tightly couple mitochondria from human early placenta. Placenta *3:* 197-210.

8. Martínez, F, Chávez, E Echegoyen, S. (1987) Decrease exchange of adenine nucleotides in human placental mitochondria. Int. J. Biochem. *19;* 275-279.

9. Aleksandroeicz, Z. (1980) Mitochondrial adenosine triphosphatase from human placenta purification and catalytic properties. Int. J. Biochem. *11:* 165-175.

10. Illsley, N P, Coade, S B y Harkness, R A. (1985) Human placental michondrial respiration and its regulation by adenine nucleotides. Placenta *6:* 187-198.

11. Scislowski, W D, Zolnierowicz, S y Zelewski, L. (1983) Subcellular distribution of isocitrate dehydrogenase in early and term human placenta. Biochem. J. *214:* 339-343.

12. Swierczynski, J, Klimek, J y Zelewski, L. (1985) The role of malic enzyme in the malate dependent biosynthesis of progesterone in the mitochondrial fraction of human term placenta.J. Steroid Biochem. *22:* 415-418.

13. Xiangxi, X, Tingsen, X, Robertson, D G y Lamberth, J D. (1989) GTP stimulates pregnenolone generation in isolated rat adrenal mitochondria. J. Biol. Chem. *264:* 17674-17680.

EDITORIAL

¿HISTOLOGIA O BIOLOGIA CELULAR?

La Estructura y la Función son dos aspectos de lo mismo. No se pueden considerar por separado. Cada detalle estructural posee su expresión funcional. Es a través de las aptitudes fisiológicas de las partes anatómicas que se hace posible la vida de los animales superiores.

Carrel (1931)

Esta pregunta adquiere actualidad, a la luz de los recientes cambios que se han dado en la Facultad de Medicina de la UNAM, de hoy. A partir de la toma de la Dirección de la Facultad por el Dr. Juan Ramón de la Fuente, un espíritu de cambio con claros derroteros hacia la academia es lo que se vive en estos momentos. Me ha tocado a partir de junio del presente año, dirigir el Departamento de Histología de la Facultad. Este es uno de los departamentos pilares de las ciencias básicas del *curriculum* del médico. Su clara tradición docente ha dejado constancia en el numeroso grupo de médicos que fueron instructores-alumnos del Departamento. Es por otro lado una materia con la que el estudiante se identifica fácilmente, ya que como el aforismo dice "una imagen vale más que mil palabras" y es más fácil identificarse con lo tangible. Además siempre se ha asociado al médico junto a un microscopio, convirtiéndose en muchas ocasiones en la imagen buscada por el futuro médico y esto es precisamente lo que se ofrecía en el Departamento.

Sin embargo, la ciencia ha avanzado a pasos agigantados en las últimas décadas y cada vez es más difícil soportar a las ciencias estáticas, meramente descriptivas de una morfología prácticamente descrita en su totalidad. Seguir ese camino es sinónimo de estatismo y ausencia de avance en la formación de un bagaje científico que soporte una actividad académica formal y progresista requerida en la formación de los médicos del siglo XXI.

Cuando se trata de deslindar las barreras de las muy diversas ramas del conocimiento agrupados en el término: ciencia, es notorio que quien lo pretende se enfrenta a una tarea sumamente compleja y difícil. ¿Quien se atreve a definir los límites de cualquiera de las ciencias básicas? Durante la formación académica del estudiante no se puede detener una sesión académica y sentenciar "este no es mi campo y por lo tanto no lo tocaremos". Un profesor bien formado recurre como premisa, a la formación integral, en la que si bien no toca con la experiencia de un experto el tema fuera de su área, si tiene la obligación de poseer las bases académicas (y de ahí la necesidad constante y contínua de cursos de actualización y de formación de profesores), que le permitan incursionar el campo de otras ramas de la ciencia sin caer en el error ni en la mentira.

En el caso de la histología, tema que nos ocupa, no es posible suponer una sesión de clase en la que se transmita única y exclusivamente el concepto morfológico microscópico puro, o si se prefiere el concepto de anatomía microscópica, porque eso ya ha dejado de existir. En el

Pasa a la pág. 29

Viene de la pág. 28

¿HISTOLOGIA...

momento en que el profesor recurre a explicar el porqué o para qué de cierta estructura, transgrede los límites de la materia e incursiona en los temas de otras áreas de las ciencias básicas. Esto es lo que se ha hecho desde prácticamente el nacimiento de la histología moderna, en la cual, a nivel de libros de texto, artículos de investigación y en la clase, se recurre como parte formal de los mismos al establecimiento de la correlación morfo-funcional, en la cual se incursiona en el campo de la fisiología, la bioquímica, la biología molecular, la farmacología, etc.

Esta realidad no aceptada abiertamente, pero realizada desde hace muchos años, ya ha sido integrada en el transcurrir del conocimiento científico y se le conoce como BIOLOGIA CELULAR. Es ésta, la principal razón del porque se propone que la materia de Histología del actual *curriculum* médico debe ser actualizada bajo el nombre de BIOLOGIA CELULAR Y TISULAR, lo que permite dar cause y reconocimiento formal a la actividad que se realiza en el aula de clase del Departamento de Histología, es decir correlacionar la estructura con la función.

Este cambio no pretende ser sólo un cambio de nombre sino también de actitud, ya que ésta nueva definición de la materia abre las posibilidades de desarrollo de líneas de investigación dentro del Departamento, que no se vean restringidas por el campo de acción de la morfología estática que es la histología, a un campo dinámico de la correlación morfo-funcional.

Alfonso Cárabez Trejo
Departamento de Histología
Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México

ALGUNOS ASPECTOS INTERESANTES DEL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LOS PARASITOS

Leonor Fernández Rivera Río, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U N A M Apartado Postal 70-159, 04510, Coyoacán, México, D.F.

RESUMEN
Los parásitos aprovechan el metabolismo de sus huéspedes y no poseen sistemas eficientes para obtener energía. Las características del metabolismo energético de los parásitos los clasifican como organismos anaeróbicos parciales. La vía glicolítica presenta una parte común a todos los organismos vivos y otra que maneja en diferentes formas el transporte de equivalentes reductores. La presencia de organelos subcelulares como el glicosoma, permite que el *Tripanosoma* aproveche eficientemente a la glucosa. Los céstodos poseen además de la cadena clásica una cadena de transporte de electrones diferente que permite la fijación de CO_2 y la reducción de ácido fumárico

PALABRAS CLAVE: Parásitos, Protozoarios, Céstodos, Glicólisis, Metabolismo, Cadena de transporte de electrones.

INTRODUCCION
El propósito de este trabajo es el de hacer una revisión acerca de algunas características fisiológicas

y metabólicas de los parásitos, con el objeto de aprovechar estos conocimientos para el diseño de estrategias para aumentar las posibilidades terapéuticas en las parasitosis. Se analizarán a continuación las características del metabolismo del *Plasmodium falciparum* y del *Tripanosoma brucei*, que son parásitos cuyo metabolismo ha sido muy estudiado y posteriormente, se analizarán las características metabólicas del céstodo *Hymenolepis diminuta* con el fin de establecer algunos puntos que parecen prometedores para diseñar estrategias de lucha contra estos parásitos.

La sobrevivencia de los organismos depende de la interacción entre estos y su entorno; los parásitos, viven dentro de otro organismo que los provee del medio; en donde los nutrientes, el pH, el potencial de oxidorreducción y los compuestos inorgánicos se encuentran en concentraciones constantes. La mayoría de las vías metabólicas y de los metabolitos son comunes en casi todos los seres vivos, sin embargo algunos metazoarios, protozoarios, bacterias y hongos poseen características especiales y diferentes de las de sus huéspedes vertebrados que permiten considerarlas como vías metabólicas alternativas; también existen algunos metabolitos comunes al huésped y al parásito pero en los que las vías metabólicas están organizadas en forma diferente. Las vías metabólicas se han conservado a través de la evolución y en algunos casos, enzimas, como por ejemplo la dihidrofolato reductasa han evolucionado en forma divergente a tal grado que sus propiedades son lo suficientemente diferentes entre el parásito y el huésped como para describirlas como nuevos blancos para la quimioterapia.

METABOLISMO ENERGETICO DE PROTOZOARIOS

El metabolismo de carbohidratos en la mayoría de los parásitos es muy activo cuando se encuentran en el estadío de infestación en el mamífero. Algunos parásitos como la *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* tienen un gran acúmulo de glucógeno que corresponde a entre 10 y 30 % de su peso seco, en cambio otro parásito como el *Tripanosoma* no tienen glucógeno, probablemente porque vive en la sangre donde las concentraciones de glucosa son constantes. La mayoría de los parásitos no oxidan a la glucosa hasta CO_2 y agua a pesar de vivir en ambientes ricos en oxígeno, por lo que se les ha considerado como fermentadores aeróbicos parciales (1). La baja eficiencia en la utilización de energía no es una desventaja para los parásitos, ya que viven en un ambiente rico en nutrientes y pueden delegar el reprocesamiento de los metabolitos a la maquinaria metabólica del huésped. Todos los organismos presentan la vía de Embden Meyerhof (2) con los mismos metabolitos intermedios desde glucosa hasta ácido pirúvico; de ahí en adelante, cada parásito adopta diferentes estrategias para la reoxidación del NADH generado durante la conversión del gliceraldehido-3-fosfato a ácido 1,3-difosfoglicérico. En el caso del *Plasmodium* (Fig 1) el NADH es reoxidado por medio de la enzima deshidrogenasa láctica, por lo que se parece al eritrocito que lo alberga. Los *Plasmodia* consumen glucosa a una velocidad de entre 10 y 30 veces mas que la del eritrocito (3). Estudios hechos sobre el antígeno p41 que induce la inmunidad al *Plasmodium falciparum* en el mono, indican que la secuencia de aminoácidos coincide en un 60% con la secuencia de la aldolasa de los vertebrados; este antígeno se expresa al final de la maduración de la fase asexual en sangre y se localiza en el compartimento citoplásmico del parásito y en los organelos secretores de la forma de merozoito. Hasta ahora, no se sabe que función desempeña este antígeno en el *Plasmodium*. La forma asexuada del *Plasmodium* parece no tener la vía del ciclo de Krebs funcional, sin embargo, los estudios de su ultraestructura indican la presencia de mitocondrias, aunque no existen pruebas de la existencia de citocromos. Las formas asexuales eritrocíticas requieren sin embargo oxígeno molecular para crecer.

GLUCOLISIS EN *Plasmodium falciparum*

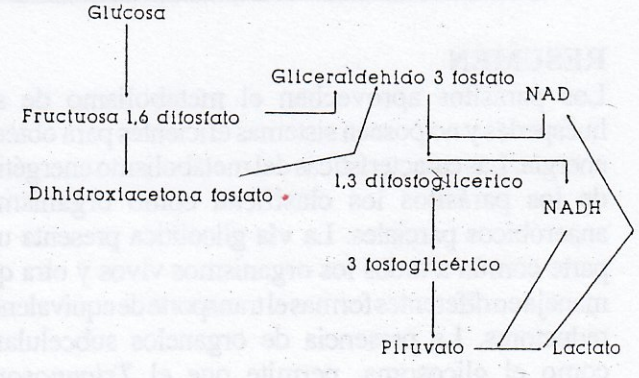

Figura 1. Glucólisis en el *Plasmodium falciparum* (3).

El metabolismo del *Tripanosoma brucei* (Fig 2) es muy interesante, ya que presenta un organelo llamado glicosoma en donde se encuentran las enzimas de la vía glucolítica (4); consume glucosa a muy alta velocidad y su metabolismo difiere del de las células de mamífero en los siguientes aspectos: a) El piruvato y el glicerol son los metabolitos finales de la glucólisis. b) Los equivalentes reductores se transfieren a una oxidasa del glicerol-3-fosfato resistente a cianuro localizada en la mitocondria y el aceptor final de electrones es el oxígeno molecular. c) En condiciones anaeróbicas, la dihidroxiacetona-fosfato actúa como aceptora de electrones y da origen a glicerol-3-fosfato, mismo que por medio de la reacción inversa de la glicerol cinasa genera glicerol y una fosforilación de ADP a nivel de substrato, por lo tanto, la glucosa da origen a concentraciones de la misma molaridad de ácido pirúvico y de glicerol, la transformación de glucosa en dos triosas se lleva a cabo con la síntesis neta de 4 ATP. La compartamentalización de la glucólisis, hace que las enzimas que catalizan la conversión de glucosa a ácido 3-fosfoglicérico trabajen con una alta eficiencia, lo que permite un elevado flujo glucolítico, aspecto muy importante, ya que es la única forma que tiene este parásito para la síntesis de ATP. En condiciones aeróbicas, la oxidación de glicerol-3-fosfato se lleva a cabo en la mitocondria, donde se oxida para dar dihidroxiacetona fosfato. La oxidasa es inhibida por el ácido salicil-hidroxámico (SHAM) y por el glicerol, lo que es aprovechado como tratamiento para matar selectivamente a estos parásitos *in vivo*. Hasta ahora se han hecho esfuerzos para sintetizar mas y mejores inhibidores de la deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato. Otra droga que se ha usado con éxito en el tratamiento de las parasitosis por tripanosoma es el arsénico que inhibe a la enzima piruvato cinasa, aún que también inhibe a las enzimas del huésped, por lo que es muy tóxico. Los glicosomas no contienen su propio ADN y la evidencia actual sugiere que el código de las proteínas glicosomales se encuentra en el núcleo. Estas proteínas se sintetizan en el citoplasma de donde pasan al glicosoma sin que tengan aparentemente modificaciones pos-traduccionales. Las enzimas glicosomales son mas grandes que las correspondientes citosólicas y poseen exceso de aminoácidos cargados positivamente, cuyo arreglo en el espacio corresponde a zonas con carga positiva a 4 nm de distancia una de otra, que probablemente sirven

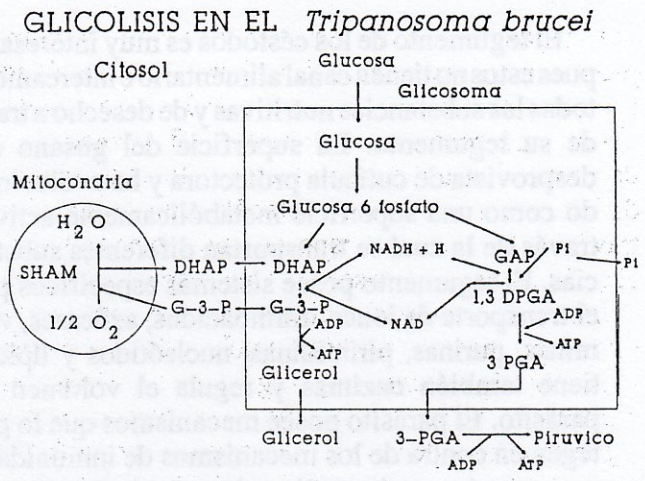

Figura 2. Compartamentalización de la glicólisis en el *Tripanosoma brucei*. SHAM: sistema inhibido por el ácido salicilhidroxámico; DHAP dihidroxi-acetona-fosfato; GAP: gliceraldehido-3-fosfato; 1,3 DPGA: ácido 1,3-difosfo-glicérico; 3 PGA: ácido 3-fosfoglicérico; G-3-P: glicerol-3-fosfato (4).

como señal para ser importadas al glicosoma. La droga Suramin usada en el tratamiento de esta parasitosis es una molécula simétrica con dos cargas negativas separadas a 4.0 nm que se pega selectivamente a las zonas con carga positiva presentes en las proteínas glicosomales. Otra particularidad del *Tripanosoma brucei* es que no tiene la enzima piruvato descarboxilasa y que el aminoácido treonina sirve como precursor de Acetil CoA.

METABOLISMO ENERGETICO DE LOS CESTODOS

En el caso de los céstodos, las cosas se complican, por ser estos organismos multicelulares y formados por múltiples tejidos (5).

Los estudios acerca del metabolismo intermedio en céstodos se enfrentan a multitud de problemas técnicos, ya que es difícil relacionar a los estudios llevados a cabo *in vitro* con los procesos que ocurren *in vivo*. Los céstodos debido al complejo sistema de transporte del tegumento, están en estado de equilibrio dinámico con sus huéspedes; al ser cambiados estos del ambiente del huesped a las condiciones *in vitro* tienden a modificar este equilibrio, por lo que esto se debe tener en cuenta al analizar los resultados experimentales. Por otro lado, de cada parásito existen varias cepas que difieren en sus característi-

cas bioquímicas. A continuación se examinan algunos aspectos del metabolismo en algunos céstodos.

El tegumento de los céstodos es muy interesante, pues estos no tienen canal alimentario e intercambian todas las substancias nutritivas y de desecho a través de su tegumento. La superficie del gusano está desprovista de cutícula protectora y ha evolucionado como una superficie metabólicamente activa a través de la cual se transportan diferentes substancias. El tegumento posee sistemas específicos para el transporte de iones, aminoácidos, azúcares, vitaminas, purinas, pirimidinas, nucleótidos y lípidos; tiene también enzimas y regula el volumen del parásito. El parásito posee mecanismos que lo protegen en contra de los mecanismos de inmunidad y en contra las enzimas digestivas del huésped.

Como todas las superficies absortivas, el tegumento presenta el fenómeno de amplificación de la superficie por medio de la aparición de vellosidades, en el caso de los céstodos, la superficie de las células que forman el tegumento contienen microespinas que se asemejan a las microvellosidades de la superficie de las células intestinales de los vertebrados. La parte apical de la mucosa está cubierta por un glicocalix compuesto por mucopolisacaridos y glicoproteínas que son producidas por el mismo tegumento y que contienen abundancia de grupos acídicos que le confieren cargas electronegativas. Las glucoproteínas predominantes tienen pesos moleculares de entre 12,000 y 237,000. Estudios hechos en *Hymenolepis diminuta* señalan que el glicocalix tiene un recambio cada 6 horas. Hasta ahora, no se sabe a que se debe la resistencia a la digestión por las enzimas del huesped, se ha demostrado que la *Hymenolepis* inhibe a las enzimas proteolíticas quimotripsina y tripsina, pero hasta la fecha no se ha podido detectar ningúna substancia inhibidora soluble en el medio y en cambio, el efecto inhibidor no se observa con otras enzimas proteolíticas como la pepsina, subtilisina y papaina.

La absorción se lleva a cabo por medio de difusión a favor de gradiente de concentración o por medio de transporte activo en el cual el sodio es bombeado hacia afuera y los metabolitos (azúcares y aminoácidos) hacia adentro, sin embargo, los mecanismos de transporte aún no han sido bien caracterizados.

Todos los céstodos parecen tener la capacidad de incorporación de glucosa por medio de transporte mediado y activo que es similar en *Hymenolepis diminuta, Hymenolepis microstoma, Taenia taeniformis* y *Taenia crassiceps*. El proceso requiere ATP y es específico para la D-glucosa, es inhibido por otras hexosas y por análogos como la 1-desoxiglucosa o por la 3-O-metilglucosa.

El glucógeno es el principal cúmulo de energía en los céstodos; estos poseen las enzimas glucógeno fosforilasa en su forma *a* y *b* que son reguladas por medio de las enzimas fosforilasa y fosfatasa que a su vez dependen de las concentraciones de AMP cíclico.

Los céstodos como la mayoría de los organismos oxidan glucosa (Fig 3) por medio de la vía de Embden Meyerhof y logran la síntesis de ATP en los pasos metabólicos que son catalizados por las enzimas 3-fosfoglicerato-quinasa (3PGK) y piruvato-cinasa (PK). Existen varias clases en la forma de oxidación de la glucosa (Fig 3); la tipo 1, en la que el producto final de la fermentación es el ácido láctico, mismo que es excretado; la segunda categoría o tipo 2, se caracteriza por un paso de carboxilación; la glucosa se degrada hasta fosfo-enol-piruvato; las enzimas PK y fosfoenol-piruvato-carboxi-cinasa PEPCK

METABOLISMO ENERGETICO DE LOS CESTODOS

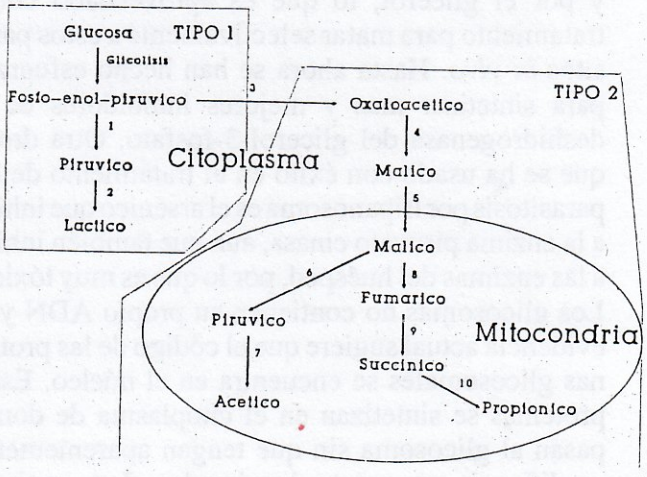

Figura 3. Metabolismo energético de los céstodos. 1: Piruvato cinasa; 2: deshidrogenasa láctica; 3: fosfo-enol-piruvato carboxi cinasa; 4: deshidrogenasa málica; 5: membrana mitocondrial; 6: enzima málica; 7: complejo de la deshidrogenasa del ácido pirúvico; 8: fumarasa; 9: reductasa del ácido fumárico; 10: complejo de la descarboxilasa del ácido succínico (6).

compiten por el fosfo-enol-piruvato presente. La PK cataliza la formación de ATP y de piruvato que se reduce para formar ácido láctico o excepcionalmente algún otro metabolito como alanina por transaminación o etanol a través de la formación de acetaldehido. En forma alternativa, la (PEPCK) cataliza la fijación de CO_2 para producir ácido oxaloacético y ATP. La deshidrogenasa del ácido málico cataliza la conversión del ácido oxaloacético a ácido málico, el malato entra en la mitocondria en donde se transforma en ácido fumárico por medio de la fumarato reductasa o en ácido pirúvico por medio de la enzima málica. El ácido pirúvico se descarboxila dando origen a la formación de acetato que se difunde al medio. Otro camino alternativo es la formación de ácido fumárico por medio de la deshidrogenasa málica (Fig 4). El ácido fumárico actúa como substrato de un complejo multienzimático de la fumarato reductasa que acepta equivalentes

METABOLISMO INTRAMITOCONDRIAL DEL MALATO EN *Hymenolepis diminuta*

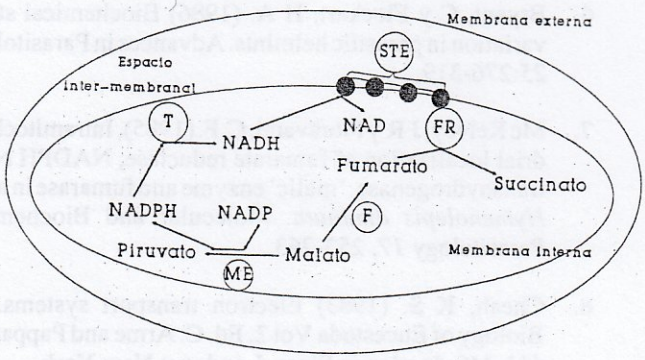

Figura 4. Metabolismo intramitocondrial del malato en *Hymenolepis diminuta*. ME: enzima málica; F: fumarasa; T: transhidrogenasa; FR: fumarato reductasa; STE sistema de transporte de electrones (7).

reductores (NADH o NADPH) y se reduce para dar succinato. Esta reducción se acompaña de la síntesis de ATP a partir de ADP mas fósforo inorgánico. Esta fosforilación involucra a la cadena de citocromos. El succinato se excreta directamente o bien se descarboxila y se excreta como propionato.

Otras vías metabólicas en nemátodos y tremátodos generan ácidos grasos de cadena ramificada (metil valerato, 2 metil butirato) como productos finales de la vía glucolítica. Se acepta que los céstodos como *Hymenolepis diminuta* excretan ácidos láctico, succínico y acético como productos finales. Los estudios del metabolismo de este parásito indican que las concentraciones de CO_2 en el medio circundante determinan las cantidades de succinato y de acetato que se excretan. Los mecanismos de control de este proceso se regulan por la interacción del parásito con el huésped y se explican de la siguiente forma:

1. En el duodeno durante el período postprandial, aumenta la concentración de CO_2 y disminuye el pH; el parásito reacciona movilizando H^+, carbonato y calcio de los corpúsculos calcáreos.
2. El aumento de la osmolaridad y del carbonato activan a la enzima PEPCK que favorece la producción de succinato en vez de lactato.
3. El succinato es un ácido dicarboxílico que tiene ventaja sobre el lactato en que puede eliminar dos protones a la vez.
4. Cuando ha pasado el período postprandial baja el estrés ácido que se ejercía sobre el parásito y disminuye la salida de carbonato y se excreta mayor cantidad de ácido láctico.

Los caminos metabólicos para el aprovechamiento de glucosa en los céstodos son predominantemente anaeróbicos, pero sin embargo, *Taenia taeniformis, Taenia hydatigena, Hymenolepis diminuta* y *Moniezia expansa* poseen mitocondrias que tienen apariencia similar a las mitocondrias de los mamíferos. La cadena de citocromos de la *Monienza expansa* (Fig 5) difiere de la cadena de citocromos de los mamíferos en que es ramificada y posee varias oxidasas terminales; una rama tiene como terminal a un citocromo parecido al citocromo a_3. La oxidasa terminal alternativa se ramifica a nivel de la rodoquinona o vitamina K y es un citocromo tipo O. Este citocromo es autooxidable y de tipo b, y se encuentra en protozoarios parásitos y en plantas. La cadena de citocromos clásica constituye el 20 % de la capacidad oxidativa de los céstodos y el citocromo O representa cuantitativamente la mayor actividad oxidativa y tiene la característica de ser poco sensible al cianuro. Otro aspecto interesante es la presencia de rodoquinona en lugar de ubiquinona.

La rama clásica contribuye a la fosforilación oxidativa y no existe evidencia de que la vía alternativa

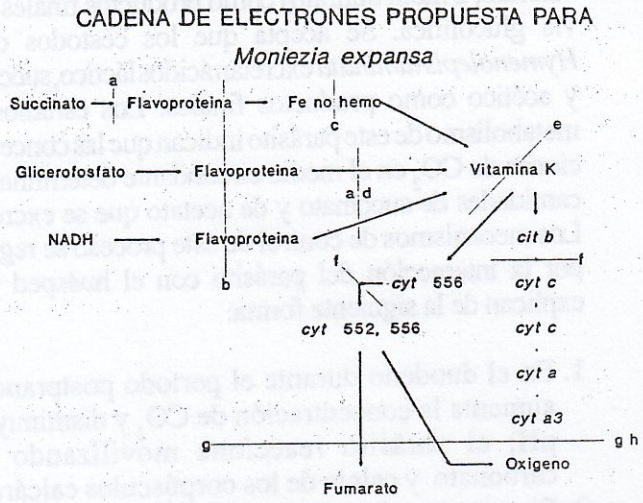

Figura 5. Cadena de electrones propuesta para *Moniezia expansa* y agentes que bloquean algunas reacciones a: amital; b: para-cloro-mercuri-benzoato; c: 2,tenoil-trifluoro-acetona; d: pilericidina A; e: dicumarol; f: antimicina A; g: monoxido de carbono; h: cianuro (8).

contribuya a la síntesis de ATP. Los céstodos fijan CO_2 y el sistema de transporte de electrones tiene un papel importante en la reducción del ácido fumárico (Fig 4); la reductasa del ácido fumárico asociada a NADH resulta en la fosforilación de ADP asociada al sitio 1 del transporte de electrones.

CONCLUSION

Existen otras vías metabólicas que han sido estudiadas en estos y en otros parásitos, pero se espera que los aspectos descritos en este trabajo, sirvan como un ejemplo de estudio del metabolismo en estos individuos y generen la inquietud y deseo para comprender mejor las características metabólicas del parásito y del huésped con el objeto de entender los mecanismos que intervienen en la interacción entre ambos a fin de mejorar las posibilidades de éxito en la lucha contra las parasitos.

REFERENCIAS

1. Von Brand T. (1979) Biochemistry and physiology of endoparasites. Elsevier North Holland Biomedical Press. Amsterdam pp 102.

2. Fairlamb, A H. (1989) Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. Parasitology *99* Suppl: S93-112.

3. Sherman, I W. (1979) Biochemistry of *Plasmodium* (malaria parasites). Microbiological Reviews *43*: 453-495.

4. Opperdoes, F R. (1982) The glycosome. Annals of the New York Academy of Sciences *386*: 543-545.

5. Smyth, J. D. y Mc Manus, D P. (1989) The physiology and biochemistry of cestodes, Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney. pp 1-304.

6. Bryant, C y Flockart, H A. (1986) Biochemical strain variation in parasitic helmints. Advances in Parasitology *25*:276-319.

7. Mc Kelvey, J R y Fioravanti, C. F. (1985), Intramitochondrial localization of fumarate reductase, NADPH NAD transhydrogenase, 'malic' enzyme and fumarase in adult *Hymenolepis diminuta*. Molecular and Biochemical Parasitology *17*, 253-263.

8. Cheah, K S. (1983) Electron transport systems. En Biology of Eucestoda Vol 2, Ed. C. Arme and Pappas, pp 421-440 Academic Press, London y New York.

EDITORIAL

EL FUTURO DEL BEB

Con cierta frecuencia me he referido a los cotidianos problemas del BEB y a su futuro inmediato. En este ensayo quisiera revisar algunas tendencias a nivel mundial que eventualmente incidirán en nuestra publicación, digamos en unos 10 años; desde luego no sólo influirán en el BEB, sino, seguramente, en la mayoría de las publicaciones científicas periódicas que actualmente se distribuyen en todo el mundo.

El grupo editorial de una revista como el BEB aspira a que: 1) los autores proporcionen información científica actualizada, bien presentada y cuya lectura sea fluída y de ser posible agradable; 2) se cuente con un elevado número de ávidos lectores que estén convencidos de invertir tiempo en la lectura de la revista y 3) la revista se distribuya en un numeroso grupo de bibliotecas que faciliten la difusión de la información contenida en ella. En resumen, y de manera cruda, los editores están inmersos en el mercado de la información científica y traten con autores, lectores y bibliotecas.

Por otro lado, los grandes expertos en el mercado de la información científica mencionan 3 macrotendencias que, de hecho, están modificando sustancialmente la difusión de la información científica: a) la nueva infraestructura técnica, b) el cambio en los hábitos de investigación y comunicación y c) la inhabilidad financiera de las bibliotecas. Revisemos brevemente dichas macrotendencias.

La nueva infraestructura técnica incluye el uso de las computadoras (u ordenadores) y su conexión, desde los mismos laboratorios, a redes de información cada vez más ricas en información y más rápidas. En consecuencia, cada dia será menos relevante el disponer de una revista impresa conteniendo la información, lo importante será tener acceso a una red que contenga una copia de la información deseada y que se transmita con rapidez (hay proyectos para transmitir más de 1,000 páginas por segundo).

El cambio en los hábitos de investigación y comunicación se apoya estrechamente en la infraestructura técnica. Las computadoras han modificado la manera de hacer la investigación; el investigador puede estudiar estructuras con ayuda de dichas máquinas como no lo hizo nunca, es capaz de hacer modelos de las porciones no bien conocidas y de simular un sinnúmero de alternativas. Las colaboraciones se establecen a través de las redes electrónicas con lo que se acelera la velocidad con la que se escriben los artículos científicos dada la facilidad para intercambiar información de manera casi instantánea. Los editores empiezan a adaptarse y ya apareció una revista en la que una vez aceptado un trabajo científico, estará disponible

Pasa a la pág. 36

Viene de la pág. 35

EL FUTURO...

en la red de comunicación para su lectura en 24 horas.

En países como México llega a ser dramático el bajo presupuesto de las bibliotecas destinado a la actualización de la información científica. Solo unas cuantas universidades pueden razonablemente enfrentar el problema de los elevados costos y el número creciente de revistas científicas. Con cada vez mayor frecuencia la información requerida no se encuentra en la biblioteca, pero puede accederse a ella a través de las redes de información. Al usuario no le preocupa si la revista está físicamente en los anaqueles de su biblioteca, lo que le interesa es poder disponer de la información, en el menor tiempo posible. La idea de biblioteca, depositaria de miles de libros y revistas, es sustituida por una computadora conectada a una eficiente red de información. La inversión de las bibliotecas paulatinamente cambia de comprar un libro o una revista y tenerlos en el librero por si alguien quiere usarlo a comprar servicios de información de aquello que específicamente le interesa al lector.

Anotado brevemente lo anterior: ¿Cuál es el futuro del BEB?. Desde mi perspectiva el futuro del BEB es halagüeño, en gran medida por tratarse de una revista donde se publican trabajos originales de revisión y de actualización.

Esperemos que nuestros autores mejoren la cantidad y calidad de sus escritos aprovechando la nueva infraestructura técnica, el cambio en los hábitos de investigación y comunicación de los científicos, así como la renovada idea de lo que es una bilbioteca moderna. Deseamos que nuestros lectores aprecien los esfuerzos de nuestros autores preparando mejores y más atractivos artículos y que la lectura sea útil para actualizarlos en áreas concretas de la bioquímica, para que sus clases sean más motivantes para los alumnos y los dejen, a profesores y alumnos, más satisfechos al saberse actualizados. Hacemos votos porque las bibliotecas con recursos financieros raquíticos reciban al BEB como una publicación que contribuya a la actualización de sus lectores en una ciencia de continuo avance como es la bioquímica. Desde mi punto de vista el BEB no sería una publicación cuya difusión tuviera éxito a través de las redes de información y pienso además que las revistas de "actualización" no serán las de elección para ser distribuídas por las redes de información conectadas a las bibliotecas.

Para terminar, una opinión relativa a la participación de los editores del BEB en el futuro de la revista. Me parece que son, somos, los principales co-responsables, junto con los autores, en preocuparnos por la excelencia de la publicación. Estamos lejos de la excelencia, pero es una meta por la cual vale la pena luchar. Un primer requisito es que nuestra revista salga a tiempo, se está logrando. La siguiente etapa es mejorar la calidad de nuestros artículos. Emprendamos una campaña de persuasión para que nuestros buenos y cada vez más numerosos investigadores bioquímicos nos escriban excelentes revisiones de sus temas favoritos. Ellos lo pueden hacer y nuestros lectores se lo merecen.

No me parece ilusorio aspirar a que antes del próximo milenio el BEB sea la mejor revista de actualización de la bioquímica escrita en español.

Enrique Piña Garza
Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de Méxi-

DAÑO CELULAR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL: I. ASPECTOS FISIOLOGICOS, BIOQUIMICOS Y ESTRUCTURALES

Alfredo Saavedra Molina. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich.

RESUMEN

Se han acumulado trabajos experimentales a través de los años que ofrecen los conocimientos fisiológicos, bioquímicos y sobre las estructuras que se afectan en la isquemia cerebral (privación de oxígeno). Sin embargo, no existe una definición clara de los mecanismos celulares por los cuales se presenta el daño cerebral y la muerte celular en condiciones de isquemia. Los aspectos fisiológicos consideran varios tipos de isquemia cerebral: completa, incompleta, global y regional o focal. Las alteraciones metabólicas producidas en la isquemia cerebral varían tanto cualitativa como cuantitativamente. En condiciones de isquemia, el cerebro consume en pocos segundos sus depósitos de energía, es decir, que la disminución del ATP da lugar a la disipación del gradiente de los iones, a la interrupción de la comunicación intracelular y como consecuencia, a un desorden en el catabolismo del tejido. Ciertas zonas en el cerebro en condiciones de isquemia, son más vulnerables que otras, debido a que poseen ciertas propiedades químicas y físicas.

PALABRAS CLAVE: Isquemia cerebral, necrosis, edema, acidosis.

I. INTRODUCCION

Las condiciones clínicas que resultan de una isquemia cerebral —privación de oxígeno—, representan en la actualidad el mayor problema en la práctica de la neurología. Los daños focales por isquemia debido a infartos, o por una isquemia global seguida de un infarto cardiaco, son cada día de más interés para el cardiólogo y el neurólogo.

Sin embargo, no existe una definición clara de los mecanismos celulares por los cuales se presenta el daño cerebral y la muerte celular en las condiciones de isquemia. Además, el problema es más complejo, debido a las diferentes formas de daño celular inducidas por la isquemia, por ejemplo: los mecanismos que dan lugar a un daño cerebral después de un período corto de isquemia total, producido por un infarto cardiaco, pueden ser de varios tipos y tener diferentes implicaciones fisiopatológicas. Las diferencias se deben, en parte, a la duración de la isquemia, a la presencia o ausencia de un período de recirculación. Al reconocerse esas diferencias, se crea, en primer lugar la demanda de modelos experimentales estandarizados, y segundo, proporciona las condiciones para proponer nuevas interpretaciones de resultados que previamente fueron considerados como contradictorios.

En este trabajo, se revisa la fisiología, la bioquímica y los cambios estructurales asociados con las condiciones experimentales del cerebro en isquemia o hipoxia.

En especial, se hace énfasis en los cambios en el parénquima cerebral, su relación con la homeostasis iónica celular y las alteraciones relacionadas con la acidosis. Además, se discuten las teorías del daño celular en cerebro en isquemia y de su posible tratamiento.

II ASPECTOS FISIOLOGICOS

Los aspectos fisiológicos relevantes, se originan en la heterogeneidad que existe entre las diferentes condiciones de isquemia. A pesar de que los mecanismos fisiopatológicos del daño cerebral por isquemia difieren considerablemente, todas esas condiciones están asociadas con una reducción en el flujo de sangre y oxígeno al cerebro.

Son tres los aspectos principales que se identifican durante la reducción del flujo de la sangre al cerebro (FSC): 1º La reducción del FSC de 0.15 a 0.20 ml/g/min hasta 0.10 a 0.12 ml/g/min, resulta en una inhibición de la transmisión sináptica, 2º se presenta un colapso de las funciones membranales, por lo que la membrana deja de mantener el gradiente de iones, lo que a su vez, 3º deteriora el estado energético de las células (1).

Existe la controversia acerca de que diferentes poblaciones de células cerebrales son más sensibles a la anoxia que otras. Sin embargo, en observaciones realizadas en perros con infarto al miocardio o monos con isquemia cerebral por torniquete (2), tanto por períodos largos (60 minutos), como por períodos cortos (15 minutos) de anoxia, se encontró que son los factores de tipo vascular, es decir, reacciones catabólicas y no la disponibilidad de oxígeno, la limitante para que sobrevivan las células afectadas.

A. TIPOS DE ISQUEMIA

Básicamente se conocen 2 tipos de isquemia: completa e incompleta. Es importante hacer notar la diferencia que existe entre detener el flujo de sangre en un estado de isquemia y el momento en que se inicia la perfusión del tejido, en donde también se tiene isquemia incompleta. En este momento, el tejido se encuentra en una acidosis láctica exagerada, lo que se traduce en un daño intenso e irreversible.

En modelos experimentales, por lo general el daño por isquemia global ocurre cuando hay oclusión de las cuatro cavidades en el corazón o cuando existe oclusión de la arteria carótida con disminución de la presión arterial; por otra parte, en la isquemia regional o focal, hay microembolia, como en la oclusión de la arteria cerebral.

Con isquemia completa o incompleta, se han identificado 2 tipos de daño cerebral: necrosis neuronal selectiva e infarto. Este último afecta a las células vasculares y gliales.

En la isquemia regional generalmente se produce un punto denso en la zona del infarto, rodeado de una zona perimetral con células, que según las condiciones, pueden sobrevivir o morir.

Se han identificado diversos factores clínicos que conducen a la isquemia, algunos de éstos se pueden desarrollar gradualmente, como es el caso de la arterioesclerosis; otros aparecen de súbito, como en la embolia o en forma transitoria como en las fallas cardiacas.

Es frecuente que el daño por isquemia sea el resultado de la combinación de varios factores, los cuales pueden ser, al principio reversibles, pero que progresan hasta lograr una isquemia completa e irreversible.

III ASPECTOS BIOQUIMICOS

Las alteraciones metabólicas producidas en la isquemia cerebral varían tanto cualitativa como cuantitativamente. Además, las técnicas de medición usadas en los modelos experimentales, modifican el metabolismo del cerebro *per se*. Podemos mencionar por ejemplo: la administración de anestésicos y los cambios en la temperatura del cerebro antes y después de la isquemia. Dado que el metabolismo de una zona en el cerebro y las manipulaciones que se hagan pueden variar entre las especies, las comparaciones de los resultados obtenidos de diferentes especies animales, pueden ser discutibles.

En vista de esta discrepancia, se analizarán en este capítulo, los aspectos bioquímicos de la isquemia suponiendo que: la respuesta metabólica en el cerebro en isquemia, es similar en todo el cerebro y que las alteraciones metabólicas observadas son debidas sucesivamente a la pérdida de energía, a las alteraciones de la homeostasis de los iones y a los cambios en el equilibrio ácido-base.

A. METABOLISMO ENERGETICO

En contraste con la alta demanda energética del cerebro, sus depósitos de energía son bajos (2). En condiciones de isquemia general, el cerebro consume, en pocos segundos, sus depósitos energéticos, y en un plazo de 2 a 3 minutos, prácticamente desaparece toda forma de energía (2). En condiciones normales, todo el trabajo celular corre a expensas del ATP, el cual proviene de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias (80%) y de la glucólisis anaerobia (20%) (3). El ATP que proviene de la glucólisis se utiliza para mantener el gradiente iónico indispensable en las

mitocondrias (2). Otras reacciones de emergencia que retrasan la pérdida del ATP, incluyen la hidrólisis de fosfocreatina. Durante la isquemia, no sólo se termina el ATP, sino también la poza de adenin nucleótidos (ADP + AMP). Además, los nucleótidos se degradan por diferentes rutas metabólicas, en las cuales se obtiene el máximo de energía, como la formación de xantina, hipoxantina y ácido úrico, compuestos que se acumulan en el tejido o se pierden en la circulación durante la reperfusión (2).

El catabolismo de los nucleótidos, que implica la formación de hipoxantina durante la isquemia, tiene al menos dos efectos: primero, la xantina oxidasa metaboliza a la hipoxantina en una reacción que produce radicales libres. Sin embargo, no se ha comprobado que esta reacción se presente después de un daño cerebral por isquemia (2). Segundo, cuando la síntesis de nucleótidos *de novo* es lenta, es fácil suponer que, durante la reperfusión, la poza de nucleótidos se puede restaurar, pero lo que se ha encontrado es una disminución en las concentraciones del ATP, después de algunas horas de recirculación.

En resumen, la disminución del ATP es el fenómeno principal durante la isquemia, y es el que da lugar a la disipación del gradiente de iones, a la interrupción de la comunicación intracelular y en consecuencia, a un desorden en el catabolismo del tejido (2). Aunque la falla en el suministro de energía dispara esta serie de cambios, los cuales pueden ser irreversibles, no se acepta como la causa directa de la muerte celular. Es más, la producción de energía a menudo se reanuda poco después.

B. HOMEOSTASIS DE LOS IONES

La interacción entre la utilización de la energía y el transporte de los iones se presenta en la figura 1. Los canales iónicos que permiten el flujo de K^+, Na^+ y Ca^{2+}, causan que se promueva el bombeo de esos cationes, el cual es dependiente de energía; específicamente, lo que sucede es que se activan: la ATPasa de Na^+-K^+, en la cual la energía del ATP crea un gradiente de K^+ y Na^+, y la ATPasa dependiente de Ca^{2+}, que se encarga de la expulsión del catión. La energía del ATP crea un gradiente de Na^+ en dirección de dentro hacia afuera de la célula.

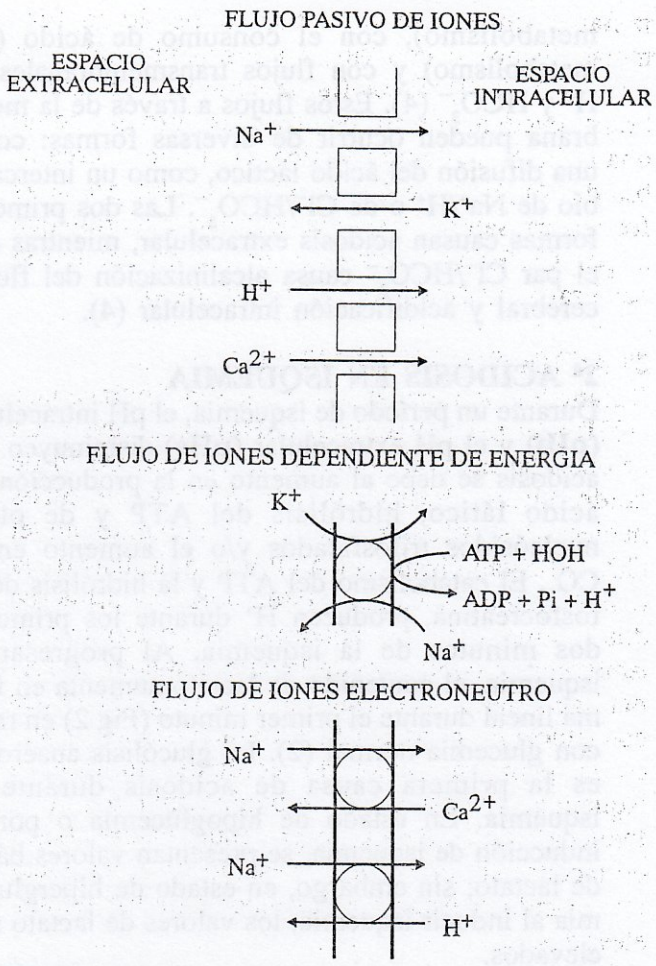

Figura 1. Mecanismos que participan en la regulación celular de Na^+, K^+, Ca^{2+} e H^+. Tomado de (2).

Por otro lado, se presenta movilización de Na^+ al interior de la célula, debido al potencial de membrana, negativo en el interior. El Na^+ penetra a la célula por la vía de los canales específicos, o a través del intercambio con el Ca^{2+} o el H^+, por medio de los transportadores de tipo antiportador.

En resumen, la energía del ATP se consume directamente para el transporte de Na^+/K^+, Ca^{2+} e indirectamente, por el intercambio Na^+/Ca^{2+} o Na^+/H^+. Claramente se observa que si el ATP disminuye durante la isquemia, como consecuencia se presenta el eflujo de K^+ y el influjo de Na^+, Ca^{2+} e H^+.

C. EQUILIBRIO ACIDO-BASE

1º CAMBIOS INTRA Y EXTRACELULARES DEL pH.

La regulación del pH intracelular cuenta con la producción de ácido (CO_2 y ácidos del

metabolismo), con el consumo de ácido (del metabolismo) y con flujos transmembranales de H^+ y HCO_3^- (4). Estos flujos a través de la membrana pueden ocurrir de diversas formas: como una difusión del ácido láctico, como un intercambio de Na^+/H^+ o de Cl^-/HCO_3^-. Las dos primeras formas causan acidosis extracelular, mientras que el par Cl^-/HCO_3^- causa alcalinización del fluido cerebral y acidificación intracelular (4).

2º ACIDOSIS EN ISQUEMIA

Durante un período de isquemia, el pH intracelular (**pHi**) y el pH extracelular (**pHe**) disminuyen. La acidosis se debe al aumento en la producción de ácido lático, hidrólisis del ATP y de otros nucleósidos trifosfatados y/o el aumento en el CO_2. El catabolismo del ATP y la hidrólisis de la fosfocreatina, producen H^+ durante los primeros dos minutos de la isquemia. Al progresar la isquemia, el contenido de lactato aumenta en forma lineal durante el primer minuto (Fig 2) en ratas con glucemia normal (2). La glucólisis anaerobia es la primera causa de acidosis durante la isquemia. En estado de hipoglucemia o por la inducción de isquemia, se presentan valores bajos de lactato; sin embargo, en estado de hiperglucemia al inducir isquemia, los valores de lactato son elevados.

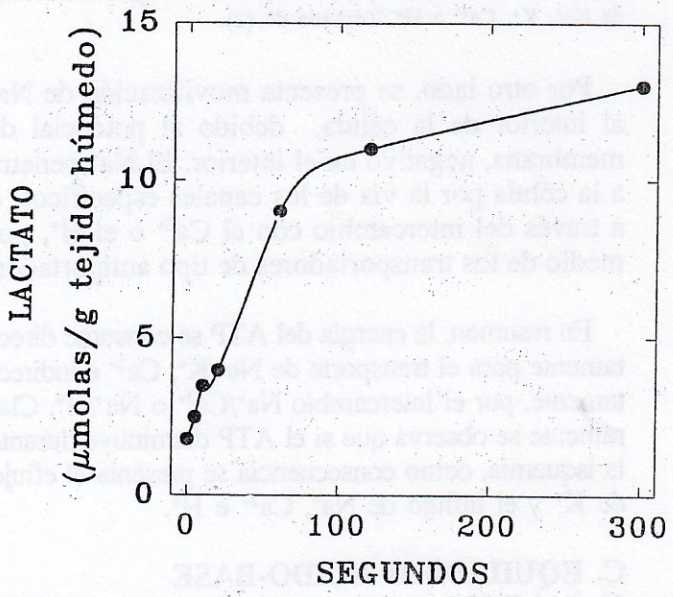

Figura 2. Efecto del tiempo en la producción de lactato en la corteza cerebral de ratas con glucosa normal, después de inducir una isquemia completa. Tomado y modificado de Bengtsoon y Siesjö (2).

Durante una isquemia completa, los ácidos provenientes del metabolismo en el cerebro, promueven la formación de CO_2 a partir de HCO_3^-. Durante una isquemia incompleta, la glucosa sanguínea determina el contenido de lactato en el tejido. Es más, en animales bien alimentados o con glucosa perfundida, pero sujetos a una isquemia incompleta, el contenido de lactato en el cerebro aumenta a valores mayores que en una glucemia normal (5).

El **pHe** disminuye rápidamente durante la isquemia (2). En animales con hipoglucemia, la isquemia produce cambios en el **pHe** que son mayores que en isquemia con glucemia normal. Es de hacer notar que los cambios en el **pHe** no necesariamente incluyen cambios en el **pHi**. Debido a esta controversia, se pregunta si el H^+ está compartamentalizado en el parénquima cerebral durante la isquemia.

Durante el período de reperfusión, después de una isquemia incompleta, se presenta una alcalosis intracelular. Los cambios que se generan en la regulación del pH después de un daño cerebral, no se conocen por completo.

ASPECTOS ESTRUCTURALES

La heterogeneidad de la respuesta histopatológica en función del daño por isquemia global en el cerebro, se reconoció desde principios de este siglo. Inclusive, se reportó que eran "ciertas neuronas vulnerables" las afectadas de forma preferente. Lo que sí es cierto, es que se observa edema cerebral, además de una zona con micro y/o macro infarto.

A. VULNERABILIDAD NEURONAL SELECTIVA

Spielmeyer, sugirió que las alteraciones locales vasculares eran de importancia para seleccionar la vulnerabilidad de ciertas zonas neuronales. Sin embargo, tiempo después se encontró que dichas zonas poseen ciertas propiedades físicas y químicas (2). Tradicionalmente se acepta que el daño de las células nerviosas por isquemia se inicia con la formación de pequeñas vacuolas, debido al hinchamiento de las mitocondrias, que tiene como consecuencia la disolución completa de la célula (6)

Resulta sorprendente que en la isquemia completa, después de 30 a 60 minutos los cambios estructurales, sean discretos (6). El citoplasma aparece dilatado, las mitocondrias comienzan a hincharse, el retículo endoplásmico aparece alargado y la cromatina agrupada. Cuando se inicia la reperfusión, aparece una zona neuronal marcadamente condensada, en la cual las mitocondrias participan en la formación de las llamadas "células nerviosas oscuras" (6). Cuando los períodos de isquemia son cortos, estas estructuras pueden o no aparecer, inclusive después de varios días.

Una de las zonas cerebrales más susceptibles es el hipocampo, el cual, después de 5 minutos de isquemia, presenta una severa zona de necrosis. Algunas de esas zonas selectivas más vulnerables son: las células de Purkinje del cerebelo, las células reticulares del hipotálamo, las células piramidales del hipocampo y en ocasiones las células de la sustancia nigra y la zona del bulbo olfatorio.

Se menciona que la "maduración" en el daño cerebral por isquemia es un punto de gran importancia (2), debido a que al principio de la isquemia, el daño es aparente. Este retraso en la muerte neuronal presenta las siguientes características: aparece por intervalos, debido a la utilización de los depósitos de energía, los cuales proveen en parte la recuperación de las funciones neurofisiológicas. La duración de estos períodos es inversamente proporcional al tiempo de isquemia. Otra característica, es que el retraso en la muerte neuronal es más corto cuando la isquemia inducida se practica con animales ayunados. Es más, esta lesión se acompaña con hipoglucemia cerebral, donde no se tiene la presencia de acidosis cerebral.

B. EDEMA CEREBRAL

Tanto en la isquemia global como en la regional, se presenta edema cerebral, es decir, aumento del agua en el tejido e hinchamiento. Se pueden distinguir dos tipos de edema: citotóxico y vasogénico (2). El edema citotóxico se caracteriza por el aumento de la osmolaridad en el cerebro, debido a la acumulación en las células dañadas de productos provenientes del metabolismo, de iones y del lactato. El edema vasogénico se debe al transporte anormal de proteínas a través de la barrera entre el cerebro y la sangre. El incremento en la permeabilidad de la barrera a las proteínas en la zona afectada por isquemia, en realidad es despreciable durante las primeras horas de reperfusión, sin embargo, el fenómeno de edema vasogénico se presenta como un fenómeno tardío, durante el período postisquémico. Lo que en realidad sucede en el edema cerebral, es que la isquemia promueve la salida de K^+ y una entrada masiva de Na^+ y Cl^-, ésto acompañado de agua. El edema vasogénico se caracteriza como un fenómeno tardío, el cual aparece en un espacio de horas o de días. Este tipo de edema se ha observado en animales sujetos a un severo daño cerebral; sin embargo, cuando el daño cerebral no es tan intenso, los animales se pueden recuperar (6), no así, cuando el animal preisquémico se presenta con una marcada hiperglucemia. Los transtornos clínicos son: hernia cerebral, epilepsia de la zona cerebelar, fisura de la barrera hematoencefálica y finalmente, la muerte.

En resumen, una isquemia incompleta se acompaña de dos tipos de edemas, que se pueden desarrollar después de un retraso en la fase de la reperfusión y cuando el sujeto en isquemia presenta un cuadro de hiperglucemia y con marcada acidosis láctica. Además, cuando se tienen fisuras del tejido cerebral, el edema es más intenso, debido a que se promueve la presencia de componentes vasogénicos.

En conclusión, los aspectos fisiológicos, bioquímicos y estructurales en condiciones de isquemia cerebral, desarrollan en una etapa inicial, cambios en el parénquima cerebral, con especial énfasis en la disminución de los depósitos de energía, los cambios en la homeostasis de los iones y las alteraciones relacionadas con la acidosis, por los cuales, traen como consecuencia, la muerte celular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento parcial de los donativos de CONACYT (0465-N9109) y de la CIC-UMSNH.

REFERENCIAS

1. Siesjö, B.K. (1988). Mechanisms of ischemic brain damage. Crit Care Med *16*: 954.
2. Bengtsson, F. y Siesjö, B.K. (1990). Cerebral Ischemia and Resuscitation, Editores: Schurr, A. y Rigor, B.M. CRC Press. Boston. pp. 216-233.
3. Erecinska, M. y Silver, I.A. (1989). ATP and Brain Function. J Cereb Blood Flow Metab *9*: 2.
4. Siesjö, B.K. (1985) Acid-base homeostasis in the brain: Physiology, chemistry and neurochemical pathology. En Progress in Brain Research. Editores: Kogure, K., Hossmann, K.A., Siesjö, B.K. y Welsh, F.A. Elsevier. Amsterdam. pp. 121.
5. Myers, R.E. (1978). Lactic acid accumulation as a cause of brain edema and cerebral necrosis resulting from oxygen deprivation. En Advances in Perinatal Neurology. Editores: Korobkin, R. y Guilleminault, G. Spectrum. New York. pp. 85.
6. Brierley, J.B. (1976). En: Greenfield's Neuropathology. Editores: Blackwood, W. y Corsellis, Jan. Edward Arnold. London. vol. *43*. pp.

PANCREAS: BIOSINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES. II. ACTIVIDAD DE *D*5-3ß-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA

Guillermo Mendoza, Federico Martínez y Juan Luis Rendón. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70159, 04510, México, D. F.

RESUMEN

Se demuestra la actividad de *D*5-3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa en tejido pancreático. La enzima se localiza en la fracción mitocondrial de homogenados de páncreas de perro y la actividad se determinó midiendo la síntesis de progesterona y androstendiona a partir de pregnenolona y dehidroepiandrosterona, respectivamente. Tanto el NAD^+ como el $NADP^+$ funcionan como aceptores de electrones en la reacción catalizada por la deshidrogenasa, pero el NAD^+ es utilizado con mayor eficiencia. Los valores de Km aparente para pregnenolona y NAD^+ fueron de 6.5 y 9.6 μM; en tanto que para dehidroepiandrosterona y NAD^+ de 3.0 y 9.6 μM, respectivamente. Esta y otras actividades previamente reportadas sugieren que el páncreas es un sitio extragonadal de síntesis de hormonas esteroides.

PALABRAS CLAVE: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, páncreas y hormonas esteroides.

INTRODUCCION

Existen evidencias que señalan la participación de las hormonas esteroides en la fisiología y patología pancreática: Se ha demostrado que el mantenimiento de la citoarquitectura normal de las células acinares del páncreas es dependiente de hormonas esteroides (1). Estudios cuali y cuantitativos sobre la distribución de hormonas esteroides en los tejidos y fluídos biológicos de diversos modelos experimentales señalan que con excepción del hígado, ya que una de sus funciones es conjugar y excretar esteroides a la bilis, el páncreas capta y mantiene durante más tiempo cantidades mayores de hormonas esteroides que cualquier otro tejido, incluyendo órganos esteroidogénicos como la próstata y el testículo o excretorios como el riñón (2,3).

Los transtornos relacionados con la función pancreática (pancreatitis e hiperlipidemias) se han descrito en pacientes que reciben terapia estrogénica, incluyendo contraceptivos hormona-

les (4-7). Datos epidemiológicos señalan que la incidencia del carcinoma de páncreas es más elevada en hombres que en mujeres (8) y un buen número de trabajos demuestran una correlación entre alteraciones en el pérfil sérico de andrógenos, niveles bajos de testosterona y carcinoma de páncreas (9-11). Comparados con el tejido pancreático de adulto normal, se reportan niveles elevados de receptores para estrogénos en las fracciones citosólica y nuclear de tejido pancreático fetal y tumoral (12), lo que sugiere, por analogía con el carcinoma de mama, que el crecimiento del carcinoma de páncreas puede ser dependiente de hormonas esteroides. Se han desarrollado modelos experimentales de carcinogénesis pancreática en las que se demuestra que la incidencia de adenomas exócrinos del páncreas es mucho más elevada en ratas macho que en hembras.

La orquídectomia disminuye la incidencia de los tumores pancreáticos, en tanto que la administración de dosis bajas de testosterona resulta en una alta incidencia de tumores en ratas de ambos sexos (13). Estos datos apoyan, de manera indirecta, la posible naturaleza "hormona-dependiente" de la carcinogénesis pancreática.

No obstante lo anterior, pocos estudios se han llevado a cabo y hay poca información disponible respecto a las capacidades potenciales de la glándula pancreática para metabolizar hormonas esteroides.

Las actividades de *D*5-3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa y *D*5-*D*4 isomerasa, en adelante denominadas 3β-HSD, catalizan la conversión de *D*5-3β-hidroxiesteroides (pregnenolona, 17α hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstendiol) a la correspondiente configuración *D*4-3-oxo (progesterona, 17α- hidroxiprogesterona, androstendiona y testosterona) que es un paso clave en la síntesis de todos los tipos de esteroides hormonales. La deficiencia congénita de 3ß-HSD es una de las causas principales del síndrome de hiperplasia suprarrenal, cuadro caracterizado por falta de diferenciación genital e insuficiencia suprarrenal grave. Mientras que en bacterias las actividades de deshidrogenasa e isomerasa fueron aisladas en proteínas diferentes, en mamíferos ambas actividades se encuentran en una misma proteína.

Este trabajo se llevó a cabo con el propósito de obtener más información sobre las vías metabólicas de hormonas esteroides que tienen lugar en el páncreas. Los resultados demuestran que el tejido pancreático puede transformar pregnenolona y dehidroepiandrosterona en progesterona y androstendiona respectivamente, haciendose evidente la presencia del sistema 3ß-HSD.

METODOS

Los páncreas de perros mestizos macho, obtenidos inmediatamente después del sacrificio, fueron transportados en hielo al laboratorio y procesados conforme se describió previamente (14). Las distintas fracciones subcelulares se obtuvieron por centrifugación diferencial clásica. La actividad del sistema 3ß-HSD se determinó, midiendo en incubaciones separadas, la conversión de pregnenolona tritiada a progesterona y de dehidroepiandrosterona en androstendiona. Para la mayor parte de los ensayos la mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 1 ml, el substrato esteroidal (50 nmol; 100,000 cpm) y 1.5 μmoles de NAD^+ disueltos en amortiguador de fosfatos 5 mM, glicerol 20% pH 7.0 y cantidades apropiadas de la fracción subcelular correspondiente como fuente de enzima. Después de incubar 10 min a 37°C la reacción se detuvo por la adición de eter etílico. Los esteroides (substratos y productos) fueron separados, previa extracción, por cromatografía en capa fina, desarrollada en el sistema cloroformo/acetona (90:8, v/v). La cantidad de producto fué expresada en nanomolas, dividiendo su radiactividad entre la radiactividad específica del substrato inicial. La actividad de 3ß-HSD fué expresada como la cantidad de producto producida por mg de proteína, por minuto.

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación de productos. Se detectó un solo producto radiactivo en los cromatogramas después de incubar pregnenolona tritiada con homogenados libres de células de tejido pancreático en presencia de NAD^+ o $NADP^+$. El producto fue identificado como progesterona por su movi-

lidad cromatográfica y por recristalización demostró tener una pureza de 96%. De manera similar, el único producto radiactivo obtenido en incubaciones conteniendo dehidroepiandrosterona tritiada y NAD^+ o $NADP^+$ en presencia de la preparación pancreática, se identificó como androstendiona por su movilidad cromatográfica y su identidad se confirmó por recristalización, con una pureza de 95%.

Distribución subcelular. La actividad de 3ß-HSD para cada uno de los substratos esteroidales se determinó en las fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial en presencia de concentraciones no limitantes de NAD^+. Los resultados se resumen en la Tabla I. Para ambos substratos esteroidales, más del 70 % de la actividad de 3ß-HSD presente en el homogenado total, se concentró en la fracción mitocondrial con el aumento correspondiente en la actividad enzimática específica. La localización mitocondrial de la 3ß-HSD pancreática resulta un tanto sorprendente, ya que las enzimas homólogas de otros tejidos se encuentran asociadas al retículo endoplásmico. Sin embargo, en la placenta humana la actividad de este sistema se encuentra igualmente distribuida en microsomas y mitocondrias y actividad substancial ha sido reportada en mitocondrias de ovarios y adrenales.

Especificidad por co-substratos. La 3β-HSD pancreática muestra una especificidad dual para co-substratos. Tanto el NAD^+ como el $NADP^+$ funcionan como aceptores de electrones en la reacción oxidativa catalizada por la deshidrogenasa. Sin embargo, la velocidad es mucho mayor en presencia del NAD^+. Con una concentración 0.2 mM de $NADP^+$, la producción de progesterona o androstendiona a partir de los substratos correspondientes, fue de 3 y 23% respectivamente; de la obtenida en presencia de NAD^+. Utilizando una concentración fija de pregnenolona (80 μM), las constantes aparentes de Michaelis (Kma) para NAD^+ y $NADP^+$ se determinarón en 9.6 μM y 2.5 mM respectivamente. Con dehidroepiandrosterona como substrato la Kma para NAD^+ fue de 9.6 μM y para NADP+ de 0.25 mM. Es interesante señalar que en presencia de NAD^+ se observa una oxidación preferencial de pregnenolona, en tanto que con $NADP^+$ la dehidroepiandrosterona es oxidada a velocidades 10 veces mayores que pregnenolona.

Influencia del pH. El efecto del pH sobre la actividad del sistema 3ß-HSD se estudió en el intervalo de pH 5.0 a pH 11, utilizando diferentes sistemas amortiguadores. La velocidad máxima de oxidación de pregnenolona se encuentra a pH 8.0. En tanto que con dehidroepiandrosterona la acti-

TABLA I

DISTRIBUCION INTRACELULAR DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA D5 3b —HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA—

ISOMERASA DE PANCREAS CANINO

FRACCION SUBCELULAR	PROTEINA mg/ml	VOLUMEN ml	SUBSTRATO: PREGNENOLONA			SUBSTRATO:DEHIDROEPIANDROSTERONA		
			ACTIVIDAD ESPECIFICA (mmol/min/mg	ACTIVIDAD TOTAL mmol/min)	ACTIVIDAD RECUPERADA (%)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (mmol/min/mg	ACTIVIDAD TOTAL mmol/min)	ACTIVIDAD RECUPERADA (%)
HOMOGENADO	13.5	480.0	0.39	2.52	100.0	0.27	1.75	100.0
NUCLEO	11.3	52.0	0.19	0.11	4.3	0.23	0.14	7.8
MITOCONDRIA	24.3	100.0	0.75	1.82	72.2	0.55	1.34	76.5
MICROSOMAS	36.0	16.0	0.38	0.22	8.6	0.26	0.15	8.6
CITOSOL	5.0	357.0	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00	0.0

vidad aumenta al incrementar el pH, alcanzando un plato aparente en el intervalo de pH 8.0 a 9.5. La velocidad de oxidación para ambos substratos esteroidales es aproximadamente igual a pH 9.0.

Saturación con substrato. El efecto de incrementar la concentración de pregnenolona o dehidro-epiandrosterona sobre la velocidad inicial de la 3ß-HSD se ilustra en la figura 1. En amortiguador de fosfatos, pH 7.0 y 37°C, la Km aparente para pregnenolona se calculó en 6.5 µM y la velocidad máxima aparente en 0.8 nmol/mg/min. En las mismas condiciones, la Km para dehidroepiandrosterona fue de 3.0 μ M y la velocidad máxima de 0.6 nmol/mg/min.

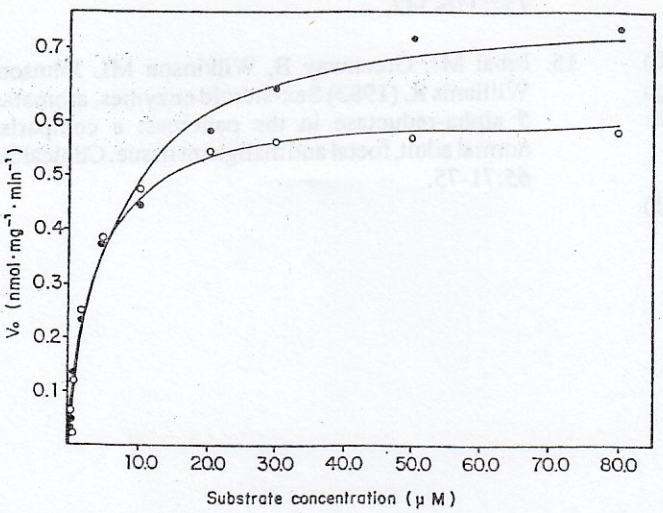

Figura 1. Gráfico directo de velocidades iniciales en función de la concentración de substrato. Pregnenolona y dehidroepiandrosterona se incubaron por separado con 0.44-0.48 mg de proteína mitocondrial en amortiguador 0.05 M de fosfatos a pH 7.0 y 1.5 mM de NAD^+ en un volumen final de 1 ml, después de 10 min a 37°C las reacciones se detuvieron adicionando 10 ml de eter dietílico. Después de la extracción y separación en cromatografía de placa fina los productos progesterona (●) y androstendiona (o) se cuantificaron por centelleo líquido. Cada punto representa la media de tres determinaciones.

Previamente Iqbal y colaboradores describieron la actividad de dos enzimas involucradas en el metabolismo de hormonas esteroides : aromatasa y 5α-reductasa, en homogenados libres de células de tejido pancreático (15). Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado la presencia de 17ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa en preparaciones de páncreas de perro. La enzima se localiza en la fracción mitocondrial, es dependiente de NAD(H) y cataliza la oxidación reversible del hidroxilo 17 ß de esteroides C18 y C19. Las constantes cinéticas calculadas para la enzima pancreática con androstendiona y testosterona como substratos, son del mismo orden de magnitud a las reportadas para las 17ß-hidroxiesteroide deshidrogenasas testiculares de cerdo, rata y humano, las cuáles estan involucradas fisiológicamente en la biosíntesis de testosterona (14).

El sistema *D*5-3ß-hidroxiesteroide-deshidrogenasa-isomerasa cataliza un paso obligatorio en las vías de síntesis de todo tipo de esteroides hormonales. Este estudio demuestra su presencia en tejido pancreático sugiriendo que esta glándula es un sitio extragonadal de síntesis de hormonas esteroides.

REFERENCIAS

1. Grossman A, Boctor AM y Lane B (1969) Dependence of pancreatic integrity on adrenal and ovarian secretions. Endocrinology *36*:956-959.

2. Ullberg S y Bengtsson G (1963) Autoradiographic distribution studies with natural estrogens. Acta Endocr Copenh *43*:75-86.

3. Kirdani RY, Varkarakis MJ, Murphy GP. y Sandberg AA. (1972) Distribution of simultaneously inyected androgens and oestrogens in animal tissues. Endocrinology *90*:1245-1251.

4. Davidoff F, Tishler S y Rosoff C (1973) Marked hyperlipidemia and pancreatitis associated with oral contraceptive therapy. New Engl J Med *289*:552-555.

5. Glueck CJ, Scheel D, Fishback J y Steiner P (1972) Estrogen-induced pancreatitis in patients with previously covert familial Type V hyperlipoproteinemia. Metabolism *21*:657-666.

6. Greenberger NJ, Hatch FT, Drummey GD y Isselbacher KJ (1966) Pancreatitis in hyperlipemia: A study of serum lipid alterations in 25 patients with acute pancreatitis. Medicine (Baltimore) *45*:161-174.

7. Jouppila P, Mokka R y Larmi TKI (1974) Acute pancreatitis in pregnancy. Surg Gynec Obstet *139*:879-882.

8. Levin DL, Connelly RR y Deveja SS (1981) Demographic characteristics of cancer of the pancreas: mortality, incidence, and survival. Cancer *47*:1456-1468.

9. Greenway B, Iqbal MJ, Johnson PJ y Williams R (1983) Low serum testosterone concentration in patients with carcinoma of the pancreas. Br Med J *286*:93-95.

10. Robles G, Díaz V, Méndez JP, Altamirano A y Wolpert E (1987) Low serum testosterone/dihydrotestosterone ratio in patients with pancreatic carcinoma. Pancreas *2*:38-43.

11. Fernández C, Robles G, Díaz V y Altamirano A. (1990) Pancreatic cancer and androgen metabolism: High androstenedione and low testosterone serum levels. Pancreas *5*:515-518.

12. Greenway B, Iqbal MJ, Johnson PJ y Williams R (1981) Oestrogen receptor proteins in malignant and fetal pancreas. Br Med J. *283*:751-753.

13. Hayashi Y y Katayama H (1981) Promoting effect of testosterone propionate on experimental exocrine pancreatic tumors by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats. Toxicology letters *9*:349-354.

14. Mendoza G, López I, Rendón JL, Díaz V y Díaz JC (1988) 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in canine pancreas. Biochem Biophys Res Commun. *152*:376-382.

15. Iqbal MJ, Greenway B, Wilkinson ML Johnson PJ y Williams R. (1983) Sex-steroid enzymes, aromatase and 5 alpha-reductase in the pancreas: a comparison of normal adult, foetal and malignant tissue. Clinical Science *65*:71-75.

OTRAS COMUNICACIONES

INTRODUCCION A LA FISIOLOGIA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES CELULARES

Evolución de una idea.

No resulta fácil precisar quien acuñó el término receptor y con que connotación. La palabra receptor no aparece en el índice final ni en la tabla de materias de uno de los libros de fisiología de 1924, el Traité élémentaire de Physiologie, escrito por E. Gley. Para 1937, Best y Taylor en su ahora clásico libro de fisiología, señalan que el receptor es un órgano que por exitación da origen a un impulso. Limita la idea de receptor al Sistema Nervioso y lo identifica estructuralmente como un órgano, recordemos que por órgano se entendía una estructura organizada con una finalidad funcional y constituída por diferentes tipos de células. También en su libro de fisiología P. Bard escribió en 1961: "receptor, célula especializada en ser exitada por pequeños cambios en su ambiente". En el libro de H. D. Patton de 1965 se lee: "receptor, porción aferente terminal (de una célula) que ocasiona una despolarización en respuesta a tipos específicos de estímulos físicos; el receptor es un sistema transductor, esto es, transforma un tipo de energía en otra". En los primeros años de la década de los 80 se aisló y purificó el receptor de la acetil colina. Se trata de un complejo polipéptido contenido en la membrana celular, el cual en situación fisiológica y en presencia de acetil colina cambia la permeabilidad de la membrana a los iones y ocasiona una despolarización de la membrana y una respuesta celular. Una definición actualizada de receptor se refiere a estructuras protéicas, de reconocimiento específico, con capacidad para iniciar una respuesta celular. Los receptores constituyen la base molecular de la comunicación intracelular. Se encuentran en prácticamente todas las células, desde las bacterias hasta las neuronas más especializadas y son el sustrato molecular de fenómenos fisiológicos tan disímbolos como la quimiotaxis, el reconocimiento celular, las respuestas inmunológicas, la acción hormonal, la distribución y movilización de colesterol en los tejidos de los mamíferos, la comunicación nerviosa, la respuesta inflamatoria, la percepción por los órganos de los sentidos, el registro de la concentración de gases en sangre, la respuesta plaquetaria, el crecimiento y la reproducción celular, la contracción muscular voluntaria, la expresión de ciertos genes, la acción de agentes opiáceos y posiblemente de todos los psicofármacos, la respuesta a las presiones sanguíneas, y hasta la memoria. La lista, no exhaustiva, es impresionante.

En cuanto a las características estructurales del receptor se cambió de órgano a célula, de célula a porción de célula y finalmente a complejo polipeptídico. Se mantiene la idea de que los receptores reconocen específicamente señales físicas o químicas y que hay respuestas particulares y específicas al ser ocupado el receptor.

Trabajos sobre receptores.

¿Cómo se acumuló tal cantidad de información en relación con los receptores? Con una cantidad todavía mayor de trabajo experimental. El Cuadro I presenta el número de artículos científicos

CUADRO I

Número de artículos científicos incluidos en el INDEX MEDICUS en el rubro RECEPTORES

AÑO	NUMERO
1960	—*
1965	357
1970	376
1975	1,078
1980	3,432
1985	6,068
1990	11,193

*No se registró la entrada receptores.

que, en el año indicado, aparecieron en el Index Medicus bajo el rubro genérico de "receptores". Para 1995 habrá más de 20,000 artículos sobre el tema si la tendencia sigue igual, serán cerca de 40,000 los que aparecerán solo durante el año 2,000.

Otro indicador del interés de los investigadores hacia los receptores se refiere al contenido de una de las publicaciones clásicas de la fisiología, el Annual Review of Physiology, volumen 53 de 1991, contiene 36 artículos, en 19 de ellos se refieren a aspectos estrechamente ligados con la fisiología de los receptores. Los siguientes ejemplos señalan los temas de actualidad:

- receptores a feromonas en levaduras,
- regulación de receptores β-adrenérgicos en estados fisiopatológicos del corazón,
- control del crecimiento y diferenciación de las células vasculares por sus receptores a proteínas extracelulares,
- factores de crecimiento cardíaco y protooncogenes,

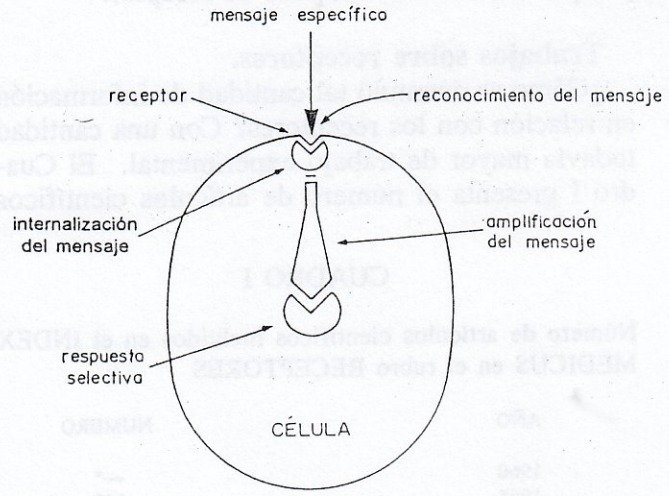

Figura 1. Características generales de los receptores.

- crecimiento y diferenciación de músculos por medio de factores de crecimiento,
- proliferación de células endoteliales por factor de crecimiento derivado de plaquetas,
-canales de K^+ (en células musculares) modificados por Mg^{2+}
- canales de K^+ (en células musculares) modificados por Mn^{2+},
- canales de iones y calmodulina en *Paramecium,*
- canales de iones y transporte de sales en el colon,
- cargas de superficie y canales,
- receptores a surfactantes pulmonares,
- control hormonal del sistema surfactante en pulmones fetales,
- receptores de las células del oído,
- receptores de las células de los órganos vestibulares,
- regulación de la respuesta de los receptores adrenérgicos por medio de la modulación en la expresión del gene del receptor,
- canales epiteliales del Na^+ y proteínas G. Respuesta al RNA en *Xenopus.*

Funcionamiento de los receptores. Características generales.

No hay duda de que cada receptor tiene sus particularidades, sin embargo, todos los receptores tienen una serie de características comunes las cuales se revisan brevemente a continuación. El receptor reconoce específicamente un mensaje, puede ser un fotón, o tratarse de una vibración a determinada longitud de onda, o una hormona, o una apoproteína. El receptor recibe así un mensaje, interacciona con él, lo reconoce y lo acepta, y el receptor al ser ocupado por el mensaje sufre un cambio conformacional para que otra molécula traduzca el mensaje originando un segundo mensajero, ahora de ubicación intracelular (Fig 1). De ordinario la señal se amplifica, en ocasiones millones de veces, y aparece una o más respuestas selectivas y siempre las mismas de acuerdo con el mensaje inicial; así por ejemplo, con la acetil colina unida a su receptor en una célula muscular siempre habrá una despolarización de la membrana y mayor entrada de sodio; con el glucagon unido a su receptor hepático se elevará el AMP cíclico y se incrementará la síntesis de urea y de glucógeno, etc, etc. Se puede enlistar y analizar las características sobresalientes para el funciona-

miento de los receptores:

-son glicoproteínas,
-tienen gran especificidad para recibir su señal (concepto agonista-antagonista),
-en la transducción de la señal interviene algún tipo de las llamadas proteínas G,
-se genera un "segundo mensajero",
-se modifica la permeabilidad de la membrana y hay movimiento de iones a través de canales,
-se activan proteínas cinasas, hay fosforilación (o metilación) de proteínas y regulación de la actividad enzimática,
-la célula posee mecanismos para amplificar enormemente la respuesta inicial (reacción en cascada),
-en un amplio rango la respuesta es proporcional a la magnitud o concentración de la señal inicial (curvas dosis respuesta),
-la respuesta final es selectiva,
-pueden regular la expresión de genes,
-las señales exageradas e iterativas en corto tiempo, bloquean al receptor (desensibilización).

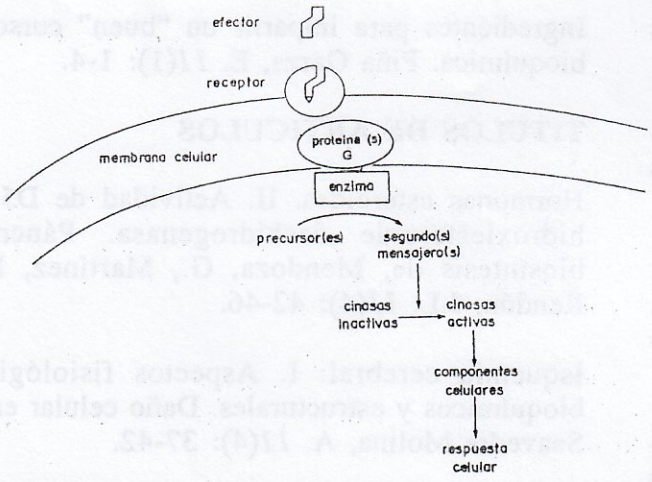

Figura 2. Esquema general de la respuesta de un receptor al ser activado por su efector.

Para el caso de las hormonas que no penetran a la célula, un esquema general de la respuesta que inician en una célula blanco, puede ser el incluído en la figura 2.

Patología de los receptores.

Llama la atención que habiendo una participación tan extendida de los receptores en la fisiología de una célula y de un organismo existan pocos casos bien estudiados donde el cuadro patológico sea consecuencia de la disfunción de un receptor. Sí hay ejemplos bien aceptados de enfermedades por alteración de ciertos receptores, grupos concretos de diabéticos y de ateroescleróticos manifiestan alteraciones en los receptores a la insulina y a las apolipoproteínas, respectivamente. Pero hay más casos de sospechas de enfermedad por disfunción de los receptores. Algunas respuestas inmunológicas anormales podrían deberse a la alteración de ciertos receptores; y hay mucho más investigación y grandes espectativas. Así por ejemplo, los ésteres de forbol mimetizan la acción de segundos mensajeros generados por la estimulación de receptores y son poderosos agentes cancerígenos, por lo que se sospecha que algunos tipos de cáncer puede resultar de cambios en el funcionamiento de ciertos receptores.

Incluso, hay quienes piensan que se identificarán en los próximos años un buen número de enfermedades atribuíbles primordialmente al mal funcionamiento de algunos receptores.

Enrique Piña Garza
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE GENERAL ANUAL DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

AUTORES DE EDITORIALES

Carábez Trejo, A. ¿Histología o biología celular? *11*(3): 28-29.

Piña Garza, E. Ingredientes para impartir un "buen" curso de bioquímica. *11*(1): 1-4.

Piña Garza, E. El futuro del BEB. *11*(4): 35-36.

Ramírez Toledano, O. La evolución de los conceptos básicos en la biología del desarrollo. *11*(2): 22-23.

AUTORES DE ARTICULOS

Espinoza-García, M.T., Martínez Montes, F. y Flores Herrera, Oscar. Características de las mitocondrias de placenta humana. *11*(2): 24-27.

Fernández Rivera Río, L. Algunos Aspectos interesantes del estudio del metabolismo de los parásitos. *11*(3): 29-34.

Mendoza, G., Martínez, F. y Rendón, J.L. Páncreas: biosíntesis de hormonas esteroides. II. Actividad de D5-3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa. *11*(4): 42-46.

Robles Flores, M. Proteína Cinasa C: mecanismos de acción y perspectivas en la comunicación celular. I. La proteína cinasa C como elemento clave en los sistemas de transducción hormonal. *11*(1): 5-11.

Robles Flores, M. Proteína Cinasa C: mecanismos de acción y perspectivas en la comunicación celular. II. Características y acción de la proteína cinasa C en la propagación de las señales hormonales. *11*(1): 12-21.

Saavedra Molina, A. Daño celular en la isquemia cerebral: I. Aspectos fisiológicos, bioquímicos y estructurales. *11*(4): 37-42.

AUTORES DE OTRAS COMUNICACIONES

Piña Garza, E. Introducción a la fisiología molecular de los receptores celulares. *11*(4): 47-49.

TITULOS DE EDITORIALES

Evolución de los conceptos básicos en la biología del desarrollo. La, Ramírez Toledano, O. *11*(2): 22-23.

Futuro del BEB. El, Piña Garza, E. *11*(4): 35-36.

¿Histología o biología celular? Carábez Trejo, A. *11*(3): 28-29.

Ingredientes para impartir un "buen" curso de bioquímica. Piña Garza, E. *11*(1): 1-4.

TITULOS DE ARTICULOS

Hormonas esteroides. II. Actividad de D5-3b-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Páncreas: biosíntesis de, Mendoza, G., Martínez, F. y Rendón, J.L. *11*(4): 42-46.

Isquemia cerebral: I. Aspectos fisiológicos, bioquímicos y estructurales. Daño celular en la, Saavedra Molina, A. *11*(4): 37-42.

Mitocondrias de placenta humana. Características de las, Espinoza-García, M.T., Martínez Montes, F. y Flores Herrera, Oscar. *11*(2): 24-27.

Parásitos. Algunos Aspectos interesantes del estudio del metabolismo de los, Fernández Rivera Río, L. *11*(3): 29-34.

Señales hormonales. Proteína Cinasa C: mecanismos de acción y perspectivas en la comunicación celular. II. Características y acción de la proteína cinasa C en la propagación de las, Robles Flores, M. *11*(1): 12-21.

Transducción hormonal. Proteína Cinasa C: mecanismos de acción y perspectivas en la comunicación celular. I. La proteína cinasa C como elemento clave en los sistemas de, Robles Flores, M. *11*(1): 5-11.

TITULOS DE OTRAS COMUNICACIONES

Introducción a la fisiología molecular de los receptores celulares. Piña Garza, E. *11*(4): 47-49.

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTICULOS DE REVISION

1) El artículo deberá enviarse en un disco flexible de 5 1/4 pulgadas de 365 KB de capacidad, escrito en los procesadores de textos *"Word 5"* o *"Write"*, sin ningún formato y con una extensión máxima de 18,000 caracteres. Este deberá ir acompañado de dos impresiones del artículo en el que se marcarán en color las palabras o líneas que deban ir en *cursivas* o **negritas**, así como todas las anotaciones necesarias. En el caso de no tener acceso a este procesador, el manuscrito podrá enviarse mecanografiado, con una extensión que no exceda de 12 cuartillas escritas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por renglón).

2) Se deberá incluir un resumen en idioma español y un abstract en inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.

3) Se sugiere un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas en el texto de forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada una debe contener: nombres de los autores, año de publicación entre paréntesis, título del artículo, nombre de la revista, número del volumen en *cursivas* y antecedido por dos puntos el número de la primera y última páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:

   Miller C O (1982) Cytokinin Modification of Mitochondrial Function. Plant Physiol *69*: 1274-1277.

   Los libros deberán citarse de la siguiente forma:

   Larckins, B A, Pearlmutter, N L y Hukman, W J (1979) The mechanism of zein synthesis and deposition in protein bodies of maize endosperm. En The Plant Seed. Development, Preservation and Germination, Editores: Rubenstein, I; Phillips, R L; Green, C E y Gengenbach, B G. Academic Press, New York, pp 49-55.

4) Se aceptarán como máximo seis figuras o tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localización deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y de referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta, las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros.

5) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de página. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.

II. OTRAS COMUNICACIONES

1) El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, etc.

2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.

3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica en el inciso I-1.

4) Se aceptarán un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto. En casos de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla.

Los manuscritos serán leídos por dos revisores, uno de ellos familiarizado con el tema y el otro ajeno al mismo. Las correcciones y sugerencias así como las pruebas de página se comunicarán al primer autor.

Los discos y las dos copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apdo Postal 70-281, México 04510, D F, o bien a través del corresponsal del BEB en su localidad.