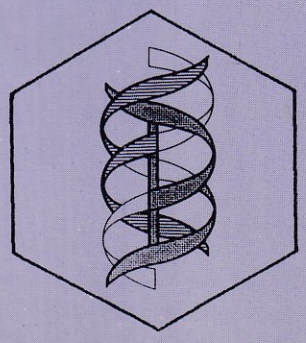
ISSN-0187/294X

BEB 95

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA



Organo de información de la
ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA, A C

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIODICA** (Indice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias).

Vol. 14 No. 3 SEPTIEMBRE 1995

COMITE EDITORIAL

EDITORES FUNDADORES

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

EDITORES

EDMUNDO CHAVEZ COSIO
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

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

JAIME MAS OLIVA
Facultad de Medicina e Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR EN JEFE

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

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

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

EDITOR ASOCIADO

MA TERESA ELIZABETH FLORES RODRIGUEZ
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

APOYO SECRETARIAL

ELISA MORA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, AC

Facultad de Medicina,
UNAM

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, CP 04510 México, D F. Certificados de: Licitud de Título No 6703; Licitud de Contenido No 6989; No de expediente 1/432"92"/8443; Reserva al título en derecho de autor No 6703. Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIODICA** (Indice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Corregio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,500 ejemplares.

EDITORIAL

DE EQUILIBRIOS, INTERCAMBIOS Y POSIBILIDADES DE DESARROLLO

Recuerdo que al cursar la materia de Geología, al inicio de la carrera de Biología, en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, aprendimos acerca de una de las teorías que más llamó mi atención: La Teoría de la Isostacia. Esta teoría se refiere a varios aspectos de la dinámica de la corteza terrestre y la fluidez del manto. Propone que el hundimiento de la corteza en algún lugar se acompaña del levantamiento en otra región distinta del globo terráqueo, lo que mantiene un estado de equilibrio dinámico. Sin tratar de ser reduccionista, pero sí práctico, algo similar se observa en las sociedades humanas: lo que les sobra a unos les falta a otros, o mejor aún, a unos les sobra porque a otros les falta. Siendo más específico, y en relación con el ámbito científico, esto es evidente entre países, instituciones y laboratorios ricos y pobres.

Muchos sabemos acerca de las diferencias que existen en la distribución de recursos entre las instituciones de educación superior en México, pero a pesar de las crisis económicas, todavía es posible distinguir entre instituciones y laboratorios con más y con menos recursos. En estas circunstancias, es común (seguramente lo fue más en el pasado que en el presente), que en las instituciones y laboratorios con más recursos se renueven y actualicen periódicamente materiales que incluyen a reactivos y o equipo. Desafortunadamente, muchas veces este material viejo y obsoleto se saca de circulación almacenándolo o, simplemente, se tira a la basura. Esto se hace así sin considerar que ese material podría ser muy valioso en alguna otra institución o laboratorio; parte de ese equipo todavía funciona, o si está descompuesto, su reparación no es muy costosa.

En los países ricos y tecnológicamente desarrollados, es común que los fondos para los proyectos contemplen un rubro para la compra de "consumibles", es decir, todo aquel material (generalmente hecho de plástico) de uso y desecho cotidiano, tal como las puntas de las pipetas automáticas, tubos de microcentrífugas, tubos de cultivo, cajas de Petri y celdas de plástico, etc. En la mayoría de las veces este material es reutilizable ya que no está

contaminado y si se le lava cuidadosamente, este tipo de materiales serían muy valiosos en muchos laboratorios de países pobres.

Así y contraviniendo a la teoría geológica de la isostacia, resultaría verdaderamente positivo el que estos materiales de "desecho" u obsoletos llegaran a los laboratorios con menos recursos. Dicho en término geológicos, que el levantamiento de algunas regiones de la corteza (los laboratorios ricos) traiga consigo al mismo tiempo el levantamiento en otros lugares (los laboratorios pobres).

Por supuesto, para que esto pueda suceder a nivel doméstico (nacional), deben existir los medios de comunicación para que los donadores puedan dar a conocer y los receptores puedan localizar el material a transferir. En nuestra área de desempeño, además de publicar artículos de revisión actualizados y dada la naturaleza y los intereses de sus lectores, el Boletín de Educación Bioquímica resulta la vía idónea para poner en contacto a instituciones, laboratorios y grupos de investigación con el fin de transferir materiales a manera de donaciones o, inclusive, de intercambio. Esto último suele suceder cuando los proyectos de algún laboratorio dan un giro y por lo tanto parte de los reactivos y del equipo quedan sin uso, pero en posibilidades de ser donados o intercambiados.

En este número del BEB se inicia una sección de "Donaciones e Intercambios entre Instituciones", que se espera sea muy activa y bien acogida por los lectores, que resulte en beneficio de aquellos laboratorios con limitaciones materiales y en el uso prolongado del material o equipo viejo, pero todavía útil.

A nivel foráneo, internacional, resultaría positivo establecer convenios gubernamentales que permitan detectar a las instituciones en los países ricos que desechan material y equipo todavía útiles. Estos pudieran donarse a laboratorios pobres o, dado el caso, comprarse a un costo muy por debajo del original. En México, una institución que podría llevar a cabo esto idealmente es el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, o determinadas dependencias en cada universidad, las cuales podrían establecer los contactos necesarios.

Raúl Arredondo Peter
Departamento de Bioquímica
Universidad de Nebraska-Lincoln, EUA.

DAÑO POR REPERFUSION EN EL MIOCARDIO

José Francisco Téllez Zenteno. Grupo AFINES, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México y Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano # 1 CP 14080 México, D F.

RESUMEN

En los últimos años se ha acumulado cierta evidencia que indica un posible daño secundario a la reperfusión miocárdica, sin embargo no se sabe exactamente si la reperfusión por sí misma es la que produce el daño o acelera el daño producido a las células durante la isquemia. Se han asociado algunos procesos con el daño por reperfusión como la aparición de arritmias, el "miocardio aturdido" y el daño vascular con ausencia de reflujo. En esta revisión se discuten las principales teorías que explican los mecanismos del daño secundario a la reperfusión miocárdica como son la sobrecarga de calcio y el daño causado por los radicales libres; así como los fármacos que se han utilizado en los últimos años para tratar de disminuir la intensidad de este fenómeno.

PALABRAS CLAVE: Isquemia, daño por reperfusión, calcio, radicales libres, miocardio.

ABSTRACT

In recent years evidence has accumulated indicating a possible myocardial injury secondary to reperfusion. However, it is not exactly known wether injury at the time of reperfusion merely represents an acceleration of the damage resulting from ischemia, or wether there is a specific additional injury caused by reperfusion itself. There are some reperfusion-associated events; such as reperfusion arrhytmias, myocardial stunning and vascular damage and no reflow. In this review it is discussed the two most important hypotheses explaining the cellular events involved in reperfusion damage: calcium overload and free radical damage; as well as drugs in use during recent years intended to lower the intensity of these phenomenon.

KEY WORDS: Ischemia, reperfusion injury, calcium, free radicals, myocardium.

INTRODUCCION

En la actualidad se reconoce a la trombolisis farmacológica como una estrategia que modifica radicalmente la perspectiva del tratamiento del infarto agudo del miocardio en las primeras horas, al lograr, en un grupo definido de pacientes, reducir el tamaño de la necrosis, preservar la función ventricular y mejorar la sobrevida (1).

En los últimos años se han acumulado evidencias que indican un posible daño secundario a la reperfusión miocárdica, sin embargo todavía no se sabe exactamente si la reperfusión por sí misma es la que produce el daño o bien si acelera el daño producido en las células durante la isquemia. El daño ha sido bien caracterizado, se han descrito características metabólicas, electrofisiológicas, morfológicas y funcionales (2). Se han asociado algunos procesos con la reperfusión (Tabla I).

TABLA I

FENOMENOS ASOCIADOS A LA REPERFUSION

1. Arritmias.
2. Daño vascular y ausencia de reflujo (no reflow).
3. Miocardio aturdido (stunning myocardium).
4. Aceleración de la necrosis por las células dañadas no letalmente durante la isquemia.
5. Edema celular y la aceleración de la necrosis de las células dañadas irreversiblemente por la isquemia.

MECANISMOS DEL DAÑO POR REPERFUSION

Se han propuesto algunas teorías que explican el daño celular secundario a la reperfusión, existen dos corrientes que tratan de explicarlo, una de ellas considera que el agente más importante es el calcio y que una sobrecarga de este ión en la célula produce el daño, la otra corriente considera a los radicales libres derivados del oxígeno como los principales agentes que participan en el daño celular secundario a la reperfusión, aunque probablemente estos dos agentes se encuentren interactuando.

Para explicar el daño secundario a la reperfusión se han creado algunos modelos. Uno de ellos es el modelo conocido como la "paradoja del calcio", el cual ha sido descrito en corazones de rata pero no en corazones de humanos. Este modelo explica que cuando el calcio es reintroducido a la célula durante la reperfusión, el resultado es un severo daño celular caracterizado por una marcada liberación de enzimas y formación de bandas de contracción.

La acumulación citosólica del calcio es el resultado de la inhibición metabólica en el período isquémico (reducción de la glucólisis y de la síntesis de ATP). Durante la reperfusión el calcio entra a la célula a través de canales de calcio, por intercambio con sodio, y por estimulación de receptores ß-adrenérgicos. Esta entrada incontrolada de calcio produce activación de fosfolipasas y proteasas que producen daño en el citoesqueleto y la membrana celular, lo que favorece también la producción de radicales libres derivados de oxígeno. El otro modelo denominado la "paradoja del oxígeno", ha sido descrito en el corazón de rata y propone que en el momento en el que se produce una súbita reintroducción de oxígeno a la célula se produce el daño por reperfusión debido a la formación de radicales libres. Durante la hipoxia, la reducción de los componentes de la cadena respiratoria, como el citocromo c1, crea las condiciones favorables para la generación de radicales superóxido por la mitocondria cardiaca, además la reducción de glutatión, glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa, que son agentes antioxidantes naturales, provoca una elevación de estos radicales como el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo que son altamente reactivos y tóxicos para la célula. Otra fuente de producción de radicales libres son los macrófagos que emigran durante el período isquémico hacia el sitio de la isquemia, estos neutrófilos tiene la capacidad de liberar enzimas proteolíticas y llevar a cabo la formación de radicales libres por lo que este mecanismo junto con el mecanismo celular aumenta la producción de estos mediadores. Por último, también se ha documentado la producción de radicales libres por la célula endotelial. El siguiente fenómeno es la peroxidación de las membranas, que daña la función de éstas al permitir una sobrecarga importante de calcio. Se les ha denominado "paradojas" ya que resulta contradictorio que siendo el calcio y el oxígeno importantes para la contracción y la respiración celular respectivamente, resulten dañinos para la célula durante la reperfusión. Hay que tener en cuenta que durante la reperfusión, la concentración de calcio y la producción de radicales libres derivados del oxígeno se elevan masivamente. Además, es necesario mencionar que la paradoja del calcio y la paradoja del oxígeno tienen mecanismos patogénicos similares (Fig 1) (3 y 4).

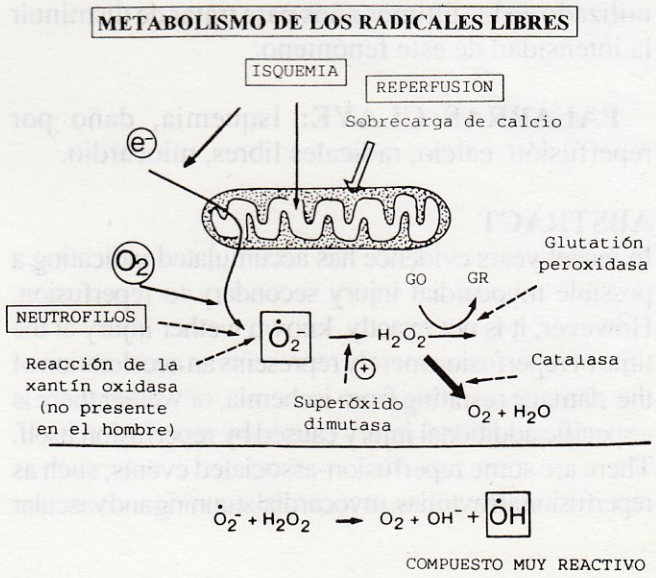


Figura 1. Se ilustra el mecanismo mediante el cual se producen los radicales libres. Está descrito que durante el período isquémico existe una formación de radicales libres que se acelera rápidamente al inicio de la reperfusión. GO) glutatión oxidado; GR) glutatión reducido.

También la presencia de glucosa durante el período hipóxico juega un papel importante en la prevención del daño por reoxigenación. Cuando el músculo papilar es privado de glucosa y oxígeno, aparecen arritmias dependientes de calcio y cuando la glucosa es añadida durante el período hipóxico previene el

desarrollo de arritmias en el período de reperfusión. Esto se ha explicado por dos mecanismos, en uno de ellos se propone que la glucosa interviene como un agente antioxidante que mantiene la vía de las pentosas y por lo tanto los niveles tisulares de glutatión, en el otro mecanismo se propone que la glucosa mantiene un aporte continuo de energía y con esto se conserva el control del calcio citosólico (5).

FENOMENOS ASOCIADOS AL DAÑO POR REPERFUSION (ARRITMIAS, "MIOCARDIO ATURDIDO", "NO REFLUJO" Y DURACION DE LA ISQUEMIA).

Uno de los fenómenos observados durante la reperfusión es la aparición de arritmias que incluyen taquicardia y fibrilación ventriculares; es importante mencionar que en la práctica clínica no es tan común la aparición de estos ritmos cardiacos anormales como en los modelos animales. La taquicardia ventricular es el tipo de arritmia que se observa con mayor frecuencia en los modelos animales, estas arritmias han sido relacionadas con la sobrecarga de calcio. En diversos estudios ha sido demostrado que las oscilaciones de calcio en la fase de reperfusión coinciden con la aparición de arritmias; el incremento de calcio durante la reperfusión pudiera tener efectos electrofisiológicos que incluyen la aparición de ritmos cardiacos anormales.

Hearse y Tosaki (6), han propuesto que la generación de arritmias se encuentra relacionada con la formación de radicales libres, estos radicales provocarían arritmias por medio del daño en la membrana celular, con los consecuentes cambios electrofisiológicos en los potenciales de acción. Estos autores concluyen que probablemente el calcio y los radicales libres derivados del oxígeno colaboren en el desarrollo de arritmias.

El "no reflujo" y el daño vascular es otro de los acontecimientos asociados a la reperfusión, ocurre cuando a pesar de ser removida la oclusión coronaria no se restaura el flujo sanguíneo, este fenómeno ha sido observado ampliamente en modelos animales y probablemente suceda en humanos. Existen algunas explicaciones para este fenómeno, primeramente se habla que el daño microvascular y la migración de los neutrófilos producen edema celular endotelial con el "no reflujo" consecuente, otro mecanismo propuesto es la formación de agregados de plaquetas y de trombos, por último se menciona que la contractura isquémica del miocardio puede comprimir las arterias coronarias impidiendo el reflujo (7).

Uno de los fenómenos que han sido estudiados ampliamente es el "miocardio aturdido" (stunning myocardium) proceso bien documentado tanto en modelos animales como en humanos, que se define como la disfunción mecánica que persiste en el miocardio reperfundido después de una isquemia reversible. El miocardio no tiene una recuperación rápida después del período de isquemia y se ha observado que la recuperación puede durar hasta 3 semanas. Para explicar la causa de la disfunción mecánica se han propuesto numerosos mecanismos, se menciona que pudiera haber una disminución en la síntesis del ATP, anormalidades en la excitación miocárdica, disminución en la actividad de la creatininfosfoquinasa, alteración de la homeostasis del calcio y la posible participación de los radicales libres del oxígeno entre otros (Fig 2) (8).

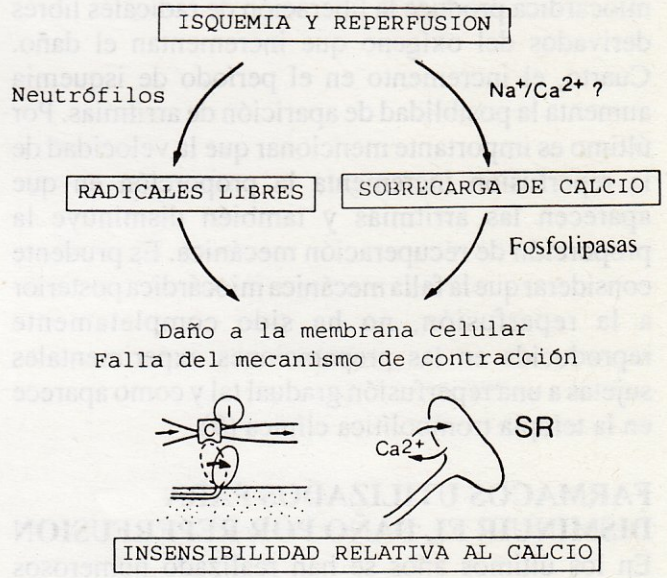


Figura 2. Se representan los dos mecanismos principales del daño por reperfusión: la formación de radicales libres derivados del oxígeno y la sobrecarga de calcio. Este esquema reconcilia estas dos hipótesis aparentemente contradictorias. Se ilustra el papel probable de la combinación de los radicales libres y la sobrecarga de calcio en el daño a la membrana celular y la insensibilidad relativa del mecanismo de contracción (a la izquierda la interacción actina-miosina, a la derecha el retículo sarcoplásmico).

Se conoce también la relación que existe entre la severidad del daño y la duración de la isquemia. El

incremento en la duración de la isquemia de 30 a 90 minutos resulta en una marcada acumulación de calcio por los tejidos, que se encuentra principalmente como calcio mitocondrial, con el aumento de la presión diastólica se produce un empeoramiento de la contractura isquímica, un daño celular exagerado y la consecuente liberación de enzimas, además de una recuperación deficiente en la función de la creatininfosfoquinasa y en la formación del ATP, si se incrementa la duración de la isquemia el daño por reperfusión sera más importante.

Cuatro líneas de evidencia sugieren que la severidad de la isquemia gobernará el daño secundario por reperfusión: Primero, la acumulación del AMP cíclico durante la isquemia predispone a la generación de oscilaciones de calcio que pueden producir arritmias dependientes de calcio en el período de reperfusión y la liberación de enzimas es más importante. Segundo, durante el período de isquemia se produce la acumulación de la palmitoil-tranferasa que causa la apertura de canales de calcio que pueden incrementar el daño. Tercero, la hipoperfusión miocárdica produce la liberación de radicales libres derivados del oxígeno que incrementan el daño. Cuarto, el incremento en el período de isquemia aumenta la posiblidad de aparición de arritmias. Por último es importante mencionar que la velocidad de la reperfusión incrementa la proporción en que aparecen las arritmias y también disminuye la proporción de recuperación mecánica. Es prudente considerar que la falla mecánica miocárdica posterior a la reperfusión, no ha sido completamente reproducida en las preparaciones experimentales sujetas a una reperfusión gradual tal y como aparece en la terapia trombolítica clínica (9).

FARMACOS UTILIZADOS PARA DISMINUIR EL DAÑO POR REPERFUSION

En los últimos años se han realizado numerosos estudios encaminados a la utilización de agentes farmacológicos con el propósito de disminuir el daño por reperfusión. Los agentes utilizados tienen acciones específicas sobre los mecanismos ya descritos (Tabla II).

Entre los fármacos utilizados se tiene a los bloqueadores de canales de calcio, de estos se ha usado la nifedipina y se observado que tiene un efecto cardioprotector modesto, en concentraciones

TABLA II

FARMACOS UTILIZADOS EXPERIMENTALMENTE EN LA PREVENCION DEL DAÑO POR REPERFUSION

Tipo de agente	Modo de acción
Secuestradores de radicales libres	
Catalasa, SOD (11)	Reacciona con iones superóxido y peróxido de hidrógeno
Dimetilurea (11)	Reacciona con radicales hidroxilo
Inhibidores de la producción de radicales libres	
Alopurinol (11)	Inhibidor de la xantin-oxidasa
Deferroxiamina (11)	Quelante de fierro
Inhibidores de los neutrófilos	
Adenosina (14)	Modula la generación de aniones superóxido
Ciclosporina (12)	Disminuye la migración de los neutrófilos
TNF Beta (15)	Inhibe la adhesión de los neutrófilos
Antioxidantes	
Vitamina E, propanolol, inhibidores de la E C A (10 y13)	Interrumpen la peroxidación
Inhibidores de la entrada de calcio	
Bloqueadores de los canales de calcio (10)	Elevación lenta del calcio intracelular
Ketorolac (12)	Disminuye la sobrecarga de calcio, actuando como ionóforo de calcio en la membrana mitocondrial

suprafarmacológicas, cuando se aplica antes del inicio de la isquemia, sin embargo no disminuye completamente la entrada de calcio producida durante la reperfusión. Otro de los agentes utilizados es el verapamil, cuyo efecto cardioprotector se manifiesta como una disminución en la liberación de creatininfosfoquinasa, reducción del tamaño del infarto, mejora la capacidad de contractibilidad, preserva la

ultraestructura y mantiene la función mitocondrial. El mecanismo propuesto para el efecto cardioprotector en los bloqueadores de canales de calcio es complejo pero incluye el ahorro de la energía, pérdida de los precursores de adenosina, disminución en la elevación de la adrenalina endógena y elevación lenta del calcio intracelular (10).

En corazones aislados de ratas existe una buena evidencia de que los agentes antioxidantes pueden disminuir algunos aspectos del daño por reperfusión, en un estudio muy convincente se demostró que la utilización de la superóxido-dismutasa (SOD), no disminuye la producción del ATP y mejora la función ventricular.

Existe un gran número de estudios en que se utilizan agentes antioxidantes pero no en todos ellos se ha observado la disminución del tamaño del infarto ni de la disfunción mecánica miocárdica, incluso existen algunos estudios con resultados negativos que simulan las condiciones que ocurren en la reperfusión trombolítica, en los que se utilizan trombolíticos más SOD y persiste la disfunción miocárdica después de 4 horas de la reperfusión. En otro estudio en el cual se utilizó SOD 5 minutos después de la reperfusión, se observó una disminución en la aparición de arritmias pero no hubo mejoría en la función contráctil. Por último en otro estudio en el cual se utilizó una combinación de SOD y catalasa, al momento de la reperfusión, se observó una mejoría en la función microvascular pero no en la función mecánica ni la extensión del infarto.

Existen estudios interesantes en que se utilizan SOD y catalasa 15 minutos antes de la isquemia en los que se ha observado una mejoría en la función contráctil del miocardio, también han sido administradas estas enzimas dos horas después de la isquemia sin que se observe mejoría en la función contráctil ni en la extensión de la necrosis, pero hubo mejoría en la microvasculatura y el flujo endocárdico, lo que sugiere la existencia de un período corto definido para la utilización de los agentes antioxidantes en la mejoría de la función contráctil.

En lo concerniente a la extensión del infarto, existen estudios convincentes en los que se adiciona SOD y catalasa 15 minutos antes del infarto en donde se observa que se reduce la extensión del infarto. En esa misma línea de estudios en que se utilizan agentes antioxidantes, existe un estudio en el cual se administró piruvato, por el antecedente de su efecto antioxidante. Este fue administrado durante el período de reperfusión en ratas y se observó un efecto cardioprotector mecánico, bioquímico y una disminución en la liberación de radicales libres. Con el propósito de disminuir el daño por reperfusión, se ha tratado de interferir en diferentes sitios, ejemplo de lo cual es el estudio realizado por Bolli (11), en que se administró deferroxiamina, un agente quelante de hierro, al tener en cuenta que el hierro es un agente que interviene en la formación de radicales superóxido y en la peroxidación de las membranas; así se observó una mejoría en la función mecánica en modelos de "miocardio aturdido".

En la búsqueda de nuevos fármacos con efecto cardioprotector, se han realizado algunos estudios en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" en los que se administró ciclosporina, fármaco muy utilizado como inmunosupresor en la actualidad, del que se aprovecha la propiedad de bloquear poros inespecíficos calcio-dependientes de la membrana mitocondrial. También se ha observado que disminuye la liberación de enzimas, así como la aparición de arritmias, con lo que se comprueba su efecto cardioprotector (12). Otro de los compuestos con efecto cardioprotector probado en esta misma institución es el Ketorolac, analgésico no esteroideo, que tiene la capacidad de actuar como ionóforo de calcio en la membrana mitocondrial, que produce una disminución en la severidad del daño por reperfusión, al disminuir la liberación de enzimas así como la aparición de arritmias en corazones de ratas, probablemente por disminuir la sobrecarga de calcio (13).

En algunos estudios recientes se han utilizado los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), como protectores del miocardio. En ellos se mencionan múltiples mecanismos para explicar este efecto. Entre ellos la reducción de angiotensina II, la reducción del metabolismo de las bradicininas, un efecto antioxidante y otros mecanismos desconocidos. Los estudios llevados a cabo en corazones aislados de ratas han demostrado que los inhibidores de la ECA atenúan el daño metabólico, la aparición de arritmias, la disfunción contráctil asociados con la isquemia y la reperfusión. En los estudios en modelos de "miocardio aturdido", después de un

período de 15 minutos de isquemia, se ha observado una mejoría en la función contráctil. A pesar de los resultados, es necesario aún realizar más estudios con estos fármacos para establecer con certeza cuál es el mecanismo cardioprotector que pudieran tener éstos.

En los últimos años se le ha dado mucha importancia, en un gran número de estudios, a la adenosina, sustancia liberada durante los períodos de isquemia, a la que se le atribuye un efecto cardioprotector durante la isquemia, al provocar vasodilatación del lecho coronario e incrementar la función contráctil y disminuir la demanda de oxígeno. Esta sustancia también se ha relacionado en un probable efecto cardioprotector durante la reperfusión al inhibir la liberación de radicales libres a partir de neutrófilos activados, lo que disminuye el daño endotelial e inhibe la agregación plaquetaria. Los estudios del "miocardio aturdido" en perros, han demostrado que la administración exógena de adenosina (50 μg/kg por minuto), aumenta la recuperación mecánica postisquémica de manera significativa (14).

La disfunción miocárdica observada en el período posterior a la reperfusión depende parcialmente de la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales, que producen daño por medio de la obstrucción física y lesiones por la liberación de productos que dañan a las células endoteliales y del miocardio.

Algunos estudios interesantes han demostrado que las citocinas, como la interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), tienen gran importancia en el desarrollo del daño, pues inducen la formación de moléculas de adherencia para los neutrófilos en las células endoteliales y miocitos (ICAM-I). Además, estas citocinas disminuyen la producción de óxido nítrico y reducen la estimulación adrenérgica y reducen la contractibilidad, es por esto que se ha pensado que probablemente el factor de necrosis tumoral-beta (TNF-β), citocina capaz de inhibir los niveles séricos del TNF-α, pudiera ser utilizado como cardioprotector, por lo que es necesario la realización de estudios para valorar su posible efecto cardiprotector (15).

CONCLUSION

Actualmente existe abundante evidencia que sugiere que el daño celular secundario a la reperfusión es bifásico, con el daño iniciado durante la isquemia y exacerbado durante la reperfusión. El daño durante la isquemia ha sido bien caracterizado en donde la célula es deprivada de la energía necesaria para mantener el gradiente iónico y la homeostasis, lo que resulta en una falla enzimática que produce la muerte celular. El daño por reperfusión está mediado, probablemente, por la interacción de radicales libres, canales de calcio, factores endoteliales y factores liberados por los neutrófilos durante la inflamación.

Existen pocos estudios a nivel clínico dedicados a disminuir el daño por reperfusión, que tengan resultados convincentes, ya que anteriormente se consideraba un artificio de laboratorio. Con la información proporcionada por los estudios experimentales, queda aún por realizar los estudios en pacientes con infarto al miocardio en donde la trombolisis farmacológica tenga éxito, esta nueva línea de investigación es una que tiene enormes perspectivas.

REFERENCIAS

1. García M L y Sánchez C J (1993) Revalidando los criterios de reperfusión no invasivos en pacientes con IAM sometidos a trombolisis farmacológica. Arch Inst Cardiol Méx *63*:463-468.
2. Marcel E y Bolli R (1994) Myocardial reperfusion injury: Fact or Myth? A 1993 appraisal of seemingly endless controversy. Ann N Y Acad Sci *723*: 218-228.
3. Hearse D J, Humphrey S M y Bullock G R (1978) The oxygen paradox and the calcium paradox: Two facets of the same problem? J Mol Cell Cardiol *10*:641-668.
4. Opie L H y DPhil M D (1989) Reperfusion injury and its pharmacologic modification. Circulation *80*:1049-1062.
5. Opie L H y Owen E P y Dennis S C (1985) Glycolysis prevents ischemic contracture. Circulation *72*:(Suppl III) III-349.
6. Hearse D J y Tosaki A (1988) Free radicals and calcium: simultaneous interacting triggers as determinants of vulnerability to reperfusion-induced arrhytmias in the rat heart. J Moll Cell Cardiol *20*:213-223.

7. Engler R L, Dahlgren M D y Morris D D (1986) Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. Am J Phisiol *251*:H314-H322.

8. Marban E (1991) Myocardial stunning and hibernation. Circulation *83*:681-688.

9. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, *et al* (1986) Intracelular myocardial ischemia and reperfusion: role of calcium and oxygen. Eur Heart J *7* (Suppl A): 3-12.

10. Nayler W G (1991) Basic mechanisms involved in the protection of the ischemic myocardium. The role of the calcium antagonist. Drugs *42* (Suppl):21-27.

11. Bolli R (1988) Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("Stunned Myocardium"). J Am Coll Cardiol *12*:239-249.

12. Arteaga D, Odor A, Lopez R M, Contreras G, Pichardo J y Chávez E (1992) Impairment by ciclosporin of reperfusion-induced arrhytmias. Life Sci *51*:1127-1134.

13. Pichardo J, Chávez R, Bravo C, Zazueta C y Chávez E (1994) Protección por ketorolac en el daño por isquemia y reperfusión miocárdica. Arch Inst Cardiol Méx *64*:325-330.

14. Sthepen W y Berne R M (1992) Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. Circulation *85*:893-904.

15. Grace P A (1994) Ischemia-reperfusion injury. Br J Surg *81*:637-647.

AVANCES Y PERSPECTIVAS EN LA CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ATPasa-Ca^{2+} DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Juan Santiago García. Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-243, 04510, México, D F.

RESUMEN

La ATPasa-Ca^{2+} es una enzima constitutiva de la membrana plasmática de las células eucarióticas, la cual transporta el calcio del citoplasma hacia el espacio extracelular a expensas de la hidrólisis del ATP. En el presente artículo se revisan los avances más importantes en la caracterización molecular de la ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática (ACMP). Esta enzima pertenece a una familia multigénica, formada por cuatro genes, donde la edición alterna de los mensajeros de cada uno de estos genes, puede a su vez generar una gran diversidad de isoformas. El análisis y la comparación de las secuencias de varias isoformas de la ACMP con diversas ATPasas tipo P, sugiere un patron estructural común entre estas enzimas, lo que ha permitido establecer y localizar la secuencia de regiones importantes para la función de estas ATPasas.

PALABRAS CLAVE: ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática, edición alterna, isoformas, homología de secuencia, ATPasas-P.

ABSTRACT

The plasma membrane Ca^{2+}-ATPase (PMCA) is an ubiquitous enzyme of eukaryotic cells which couples the hydrolysis of ATP to calcium transport from the cytoplasm to the extracellular space. In this article, the main advances in the molecular characterization of the PMCA are reviewed. This enzyme belongs to a multigene family codified by four genes where alternative splicing of the mRNAs from each of these genes can generate several isoforms. Sequence analysis and aligment between the PMCA isoforms and several P type ATPases, suggest a similar structural pattern. These studies have also allowed to establish the sequence of regions funtionally important in these ATPases.

KEY WORDS: Plasma membrane Ca^{2+}-ATPase, alternative splicing, isoforms, sequence homology, P type ATPases.

I. INTRODUCCION

La membrana plasmática es altamente impermeable al calcio, por lo que se mantiene un gradiente de concentración entre el interior y el exterior. La concentración del ión calcio (Ca^{2+}) en el espacio extracelular es de 1 a 3 x 10^{-3} M, mientras que su concentración en el citoplasma es de 10^{-7} M. Como respuesta a diversos estímulos hormonales, eléctricos y químicos, la célula permite la entrada masiva de calcio a través de canales localizados en la membrana plasmática. Así mismo, se induce la liberación de Ca^{2+} de varios reservorios intracelulares. El aumento en la concentración citoplásmica de este catión constituye la señal para disparar una gran variedad de respuestas celulares como son: la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular, liberación de hormonas, etc. Para recuperar su condición basal, la célula debe restablecer su concentracion intracelular de calcio a niveles submicromoleculares, de otra forma permanecería constantemente activada y eso la conduciría a la muerte. Las células cuentan con varios mecanismos para remover el exceso de Ca^{2+} del citoplasma como son: la ATPasa-Ca^{2+} localizada en la membrana del retículo sarco(endo)plásmico y que transporta el Ca^{2+} del citoplasma al lumen del retículo a expensas de la hidrólisis del ATP. También se han descrito sistemas de transporte de calcio en la mitocondria, orgánulo que parece participar como amortiguador de las concentraciones de este catión.

Por otro lado, en la membrana plasmática existen dos mecanismos que permiten la salida de Ca^{2+} de las células, un intercambiador Na^{+}-Ca^{2+} (acoplado a la

ATPasa-Na^+/K^+) y la ATPasa-Ca^{2+}, enzima que bombea el exceso de Ca^{2+} hacia el exterior de la célula a expensas de la hidrólisis del ATP. El intercambiador es un sistema de baja afinidad y alta capacidad (presente sólo en algunos tipos celulares), mientras que la ATPasa-Ca^{2+} es de alta afinidad pero baja capacidad.

La importancia de la ACMP radica en su capacidad de remover el exceso de calcio del citoplasma hasta restablecer los niveles encontrados en el estado de reposo (10^{-7} M), debido a que tiene una afinidad 10 veces mayor para el Ca^{2+} en relación a la ATPasa-Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico.

II. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ATPasa-Ca^{2+} DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Desde la demostración de su existencia en eritrocitos de humano en 1966, la ACMP ha sido caracterizada y purificada a partir de una gran diversidad de tejidos y tipos celulares. Estos estudios sugieren que la ATPasa-Ca^{2+} es una enzima constitutiva de la membrana plasmática de las células eucarióticas (1 y 2). Esta enzima, transporta o bombea el Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular a expensas de la hidrólisis del ATP, con una estequiometría Ca^{2+}/ATP cercana a uno (3). La ACMP está formada por un solo polipétido con una masa molecular aproximada de 130 a 140 kDa. Durante su ciclo catalítico forma un intermediario fosforilado, por la transferencia del fosfato gamma del ATP a un residuo específico de ácido aspártico y su actividad es inhibida por el ortovanadato. Debido a estas dos características, esta enzima ha sido clasificada dentro del grupo de las ATPasas tipo P.

La $K_{0.5}$ para el Ca^{2+} es de aproximadamente 10^{-6}M; sin embargo, la enzima alcanza una activación máxima entre 10^{-5} a 10^{-4} M, las concentraciones mayores de este catión provocan inhibición. Su actividad depende de las concentraciones micromoleculares de Mg^{2+} libre y tiene una alta especificidad por el ATP como sustrato. Una propiedad distintiva de la ACMP es su estimulación por interacción directa con calmodulina, propiedad que ha sido aprovechada para purificar a la enzima de diversos tipos celulares por medio de columnas de calmodulina-sefarosa. En presencia de concentraciones óptimas de calmodulina (1nM), la Km (Ca) disminuye de 20 μM a cerca de 0.5 μM y la Vmax aumenta. En ausencia de calmodulina la ATPasa es estimulada por fosfolípidos ácidos o ácidos grasos poliinsaturados (2 y 3), tratamiento con enzimas proteolíticas (1 a 3), fosforilación por proteína cinasa A, o proteína cinasa C (3). Cuando la enzima se trata con tripsina pierde su respuesta a la calmodulina, debido al corte del extremo carboxilo terminal (ver sección V), por lo que la enzima se mantiene permanentemente activada (1 a 3). A diferencia de la tripsina, la proteasa calpaina puede tener efectos importantes *in vivo*, debido a que la calpaina ataca preferencialmente proteínas que presentan dominios de unión a calmodulina (3). En ausencia de calmodulina, la calpaina corta un fragmento del carboxilo terminal que contiene los dominios de unión a la calmodulina y genera una enzima activada de 127 kDa (3). Sin embargo la presencia de calmodulina retrasa la proteólisis por calpaina y altera el patrón de corte (para una revisión más detallada de las propiedades de la ACMP consultar referencias 1 a 4).

III. DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA ATPasa-Ca^{2+} Y LA IDENTIFICACION DE DIVERSAS ISOFORMAS

La determinación de la secuencia de aminoácidos de los fragmentos trípticos que continen los sitios de unión al isotiocianato de fluoresceina (FITC), que se considera el sitio de unión al ATP y de las ATPasas tipo P y la secuencia del sitio de unión de calmodulina de la bomba de calcio de eritrocitos de humano, constituyeron el punto de partida para iniciar la clonación y determinación de la secuencia de la ACMP. En 1988, se publicó la secuencia completa de dos isoformas de esta enzima a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro de rata (5). En el mismo año se reportó la secuencia de una isoforma de esta enzima, deducida a partir de una biblioteca de ADNc de un teratoma de humano (6).

El análisis de diversas bibliotecas de ADNc de rata, humano, conejo y bovino, así como la determinación de secuencias de péptidos pequeños de la ATPasa-Ca^{2+} de eritrocitos de humano, han permitido deducir la secuencia completa de aminoácidos de tres isoformas de la ACMP de rata, tres isoformas en humano, una en conejo y la secuencia parcial de una isoforma en bovino (5 a 11).

Las ACMP de células de mamífero varían en tamaño, entre 1,159 y 1,258 residuos de amino-

ácidos, con masas moleculares calculadas entre 127.3 a 138 kDa (Tabla I). Las isoformas correspondientes entre humano y rata muestran una similitud del 97 al 99%, mientras que los productos de los genes diferentes en una misma especie muestran de 75 a 85% de similitud en su secuencia (4). En conjunto con estos reportes, el análisis de bibliotecas de ADN genómico, así como los estudios de reacción en cadena de la polimerasa, han permitido establecer la existencia de cuatro genes que codifican para esta enzima.

La edición alterna de los mensajeros de cada uno de estos genes puede generar, a su vez, una gran diversidad de isoformas (3, 4, 11 a 14, Tabla I y Fig 1). Esto ha demostrado que la ACMP pertenece a una familia multigénica y sugiere la posibilidad de que la actividad de la ATPasa-Ca^{2+} observada en la membrana plasmática puede ser el resultado combinado de los productos de varios de estos genes.

TABLA I

Isoformas de la ATPasa-Ca^{2+} de la Membrana Plasmática

Isoforma	Especie	Variantes	Número de residuos	Masa Molecular calculada
ACMP1	Rata, conejo	1a	1,176	129,500
	cerdo y humano	1b	1,220	134,700
		1c	1,249	137,800
		1d	1,258	138,800
ACMP2	Rata y	2f	1,198	132,600
	humano	2g	1,243	136,800
		2h	1,212	134,000
ACMP3	Rata	3a	1,159	127,300
ACMP4	humano	4a	1,170	129,400
		4b	1,205	133,900
		4g	1,169	130,300
?	Bovino	?	71	7,700

Modificada de la referencia 3.

La edición alterna de los mensajeros puede ocurrir en cuatro sitios denominados A, B, C y D (Fig 1), pero principalmente se ha observado en los sitios A y C. El sitio A se localiza hacia el extremo amino terminal y está próximo al sitio de interación o regulación por fosfolípidos. Todos los genes, excepto el gen de la ACMP1 presentan edición alterna a nivel del sitio A. Para el gen 2 existen tres exones de 33, 60 y 42 pb, que pueden incluirse en el ARNm maduro en varias combinaciones, que generan tres posibles variantes denominadas: 2z, 2x y 2w, las cuales tienen inclusiones de 0, 42 y 135 pb respectivamente (12 y Fig 1B). En humanos, el exón de 42 pb se inserta de manera separada, mientras que los exones de 60 y 33 pb se usan o insertan en conjunto con el exón de 42 pb (Fig 1B). En el caso de la rata (en algunos tejidos), los exones de 33 y 60 pb se pueden incluir en el ARNm sin el exón de 42 pb, de esta manera se genera una cuarta variante denominada 2y (14). Para el gen 3 de la ACMP, se ha encontrado un exón de 42 pb que puede ser incluido (variante 3x), o excluido del ARNm (variante 3z). Para el gen 4 de la ACMP, la edición alterna puede generar dos posibles variantes (4z y 4x), por la exclusión o inclusión de un exón de 36 pb (Fig 1B).

El sitio C se localiza en la región carboxilo terminal de la enzima y comprende a uno de los dominios de interacción con calmodulina (Fig 1A). Para el gen 1, la edición alterna en este sitio incluye a un exón de 154 pb que presenta tres sitios donadores internos que puede generar un total de 5 variantes denominadas 1a, 1b, 1c, 1d y 1e (Fig 1C). Para el gen 2, existe un exón de 227 pb cuya exclusión o inclusión genera dos posibles variantes, 2b y 2a respectivamente (Fig 1C). Para el caso del gen 3, la edición es más compleja, incluye 2 exones de 154 y 68 pb que al editarse diferencialmente pueden generar tres variantes (3b, 3a y 3g). La variante 3b no presenta inclusión alguna, la variante 3a incluye el exón de 154 pb, mientras que la variante 3g incluye el exón de 154 y 68 pb. En la rata se ha detectado una variante adicional, debido a que el exón de 154 pb presenta un sitio donador interno (13). En relación al gen 4, en humanos se pueden generar dos posibles variantes (4a y 4b), por la presencia o ausencia de un exón de 154 pb (Fig 1C).

Sin embargo, en el laboratorio identificamos y clonamos una tercera variante que se denominó 4d, que se genera por la presencia de un sitio donador interno en el exón de 154 pb. Esta nueva variante incluye solamente 108 pb, lo que provoca un cambio en el marco de lectura, para dar origen a una proteína más grande. La edición alterna a nivel del sitio C, puede dar origen a proteína con una sensibilidad o respuesta diferente a la calmodulina.

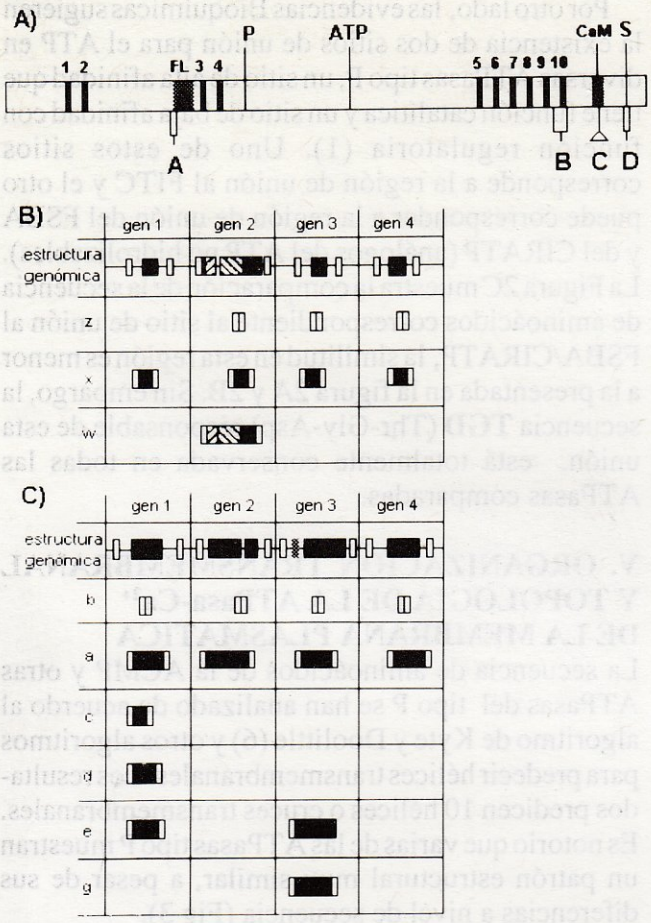


Figura 1. Edición alterna de los mensajeros que codifican para la ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática. **A)** Representación esquemática de la secuencia de la ACMP, donde se indican los sitios de edición alterna A, B, C y D, los 10 cruces membranales, sitio de fosforilación (P), sitio de unión de FITC/ATP, dominios A y B de unión a calmodulina, región de estimulación por fosfolípidos (FL) y sitio de fosforilación por proteína cinasa A (S). **B) y C)** Edición alterna y generación de las posibles variantes a nivel de sitio A y sitio C respectivamente, para los cuatro genes de la ACMP de humano. Los rectángulos corresponden a exones, las líneas horizontales a intrones y las letras a-e, w-z indican las posibles variantes.

Las variantes generadas a nivel del sitio B únicamente se han observado de manera aislada para el ARNm del gen 4 (4). La edición alterna en este sitio es de gran interés para la topología de la enzima, debido a que incluye un exón que codifica para el dominio transmembranal 10. De tal manera que si se excluye este exón originaría proteínas que carecen del cruce membranal 10. Si esta isoforma se sintetiza y es funcional, entonces habría que modificar el modelo propuesto para la estructura de la ACMP. Es decir, se tendría que proponer un modelo con 8 cruces membranales, debido a que es improbable que la enzima cruce la membrana un número impar de veces, básicamente por que el carboxilo terminal, donde se encuentra el sitio de interacción con la calmodulina y los sitios de fosforilación por proteínas cinasas, se han ubicado en la parte citoplásmica (ver sección de topología de la enzima). La edición a nivel del sitio D incluye una secuencia que constituye el substrato para una proteína cinasa A, que está ausente en la ACMP1a de rata, así como en la isoforma 4a de eritrocitos de humano (3 y 4).

Es importante resaltar que la edición alterna de los mensajeros se da en sitios importantes para la regulación de la ATPasa (sitio de interacción con fosfolípidos y sitio de interacción con calmodulina), mientras que las regiones que participan en la catálisis no sufren edición alterna y el patrón de plegamiento parece estar altamente conservado entre las diversas ATPasas de tipo P (3). Sin embargo, el significado funcional de toda esta gran diversidad de isoformas aún no está claro. Lo que en la actualidad se ha demostrado es que las isoformas 1b y 4b se expresan de manera constitutiva en todos los tejidos estudiados, mientras que la expresión de las otras isoformas es tejido específica (12).

IV. DETERMINACION DE SECUENCIAS Y REGIONES CONSERVADAS ENTRE LA ATPasa-Ca^{2+} Y ATPasas TIPO P

Diversos estudios de marcaje directo, seguidos de proteólisis y o ruptura con bromuro de cianógeno, purificación y secuencia de péptidos, han permitido identificar la secuencia de aminoácidos del sitio de formación del intermediario fosforilado y del sitio de unión de la FITC (considerado el sitio de unión al ATP). Asimismo, han permitido determinar la secuencia del sitio de unión de algunos análogos del ATP no hidrolizables como lo son: el 5'-[p-(fluorosulfonil)benzoil]adenosen (FSBA) y el gamma-[4-(N-2-cloroetil-N-metilamino)bencil] ATP (CIRA-TP)), considerado como el sitio de unión del ATP de baja afinidad. Otros estudios similares han permitido deducir las secuencias de la ATPasa-Ca^{2+} que interaccionan con la calmodulina. De manera complementaria a estos estudios, la comparación y análisis de las secuencias de diversas isoformas de la ACMP con las secuencias de otras ATPasas tipo P, han permitido determinar y establecer las secuencias de aminoácidos que participan en la

unión del ATP, sitio de fosforilación y otros (Fig 2).

La Figura 2A muestra la comparación de la secuencia del sitio de unión a FITC (sitio de unión al ATP) de tres isoformas de la ACMP y otras tres ATPasas tipo P. Es importante destacar el alto grado de similitud de las secuencias en torno a este sitio, hay cuatro residuos que se conservan, lisina (K) (residuo al que se une el FITC), glicina (G), alanina (A) y ácido glutámico (E).

A)

```
ACMP1h   M Y S K G A S E I I L R
ACMP1r   I F S K G A S E I I L K
ACMP2r   M Y S K G A S E I V L K
ACRS     M F V K G A P E G V I D
ANaK     L V M K G A P E R I L E
AHK      L V M K G A P E R V L E
```

B)

```
ACMP1h   M G N A T A I C S D K T G T L T M
ACMP1r   M G N A T A I C S D K T G T L T M
ACMP2r   M G N A T A I C S D K T G T L T T
ACRS     L G C T S V I C S D K T G T L T T
ANaK     L G S T S T I C S D K T G T L T Q
AHK      L G T C S V I C S D K T G T L T Q
```

C)

```
ACMP1r   697 C Q R A G I T V R M V T G D N I N T A R A I A 719
ACMP1r   787 E Q R Q - - V V - A V T G D G T N D G P A L K 806
ACRS     690 L Q S F D E I T - A M T G D G V N D A P A L K 711
ANaK     698 C Q R Q G A I V - A V T G D G V N D S P A L K 719
AHK      714 C Q R L G A I V - A V T G D G V N D S P A L K 735
AKEc     506 Y Q A E G R L V - A M T G D G T N D A P A L A 527
AHL      623 Q N R - G Y L V - A M T G D G V N D A P S L K 643
AHNc     623 Q Q R - G Y L V - A M T G D G V N D A P S L K 643
```

Figura 2. Comparación de secuencias de las ACMP con secuencias de otras ATPasas tipo P. **A)** Comparación de secuencias correspondientes al sitio de unión de FITC/ATP. **B)** Comparación de secuencias correspondientes al sitio de fosforilación o de formación del intermediario fosforilado. **C)** Comparación de secuencias correspondientes al sitio de unión de análogos del ATP no hidrolizables (FSBA y CIRATP). Las abreviaturas corresponden a: ACMP1h, ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática isoforma 1 de humano; ACMP1r, ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática isoforma 1 de rata; ACMP2r, ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática isoforma 2 de rata; ACRS ATPasa-Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico; ANaK, ATPasa-Na^+/K^+; AHK, ATPasa-H^+/K^+; AKEc, ATPasa-K^+ de *Escherichia coli*; AHL, ATPasa-H^+ de levadura; AHNc, ATPasa-H^+ de *Neurospora crassa* (tomado de la referencia 5).

De manera similar, la Figura 2B muestra la comparación de la secuencia de aminácidos del sitio de formación del intermediario fosforilado. Al igual que el sitio de unión al FITC, esta región está altamente conservada en las ATPasas tipo P y se puede observar la secuencia característica **ICSDKTGTLTM**, donde el residuo de ácido aspártico (D) es el responsable de formar la unión covalente con el fosfato gamma del ATP.

Por otro lado, las evidencias Bioquímicas sugieren la existencia de dos sitios de unión para el ATP en diversas ATPasas tipo P, un sitio de alta afinidad que tiene función catalítica y un sitio de baja afinidad con función regulatoria (1). Uno de estos sitios corresponde a la región de unión al FITC y el otro puede corresponder a la región de unión del FSBA y del CIRATP (análogos del ATP no hidrolizables). La Figura 2C muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos correspondiente al sitio de unión al FSBA/CIRATP, la similitud en esta región es menor a la presentada en la figura 2A y 2B. Sin embargo, la secuencia **TGD** (Thr-Gly-Asp) responsable de esta unión, está totalmente conservada en todas las ATPasas comparadas.

V. ORGANIZACION TRANSMEMBRANAL Y TOPOLOGIA DE LA ATPasa-Ca^{2+} DE LA MEMBRANA PLASMATICA

La secuencia de aminoácidos de la ACMP y otras ATPasas del tipo P se han analizado de acuerdo al algoritmo de Kyte y Doolittle (6) y otros algoritmos para predecir hélices transmembranales. Los resultados predicen 10 hélices o cruces transmembranales. Es notorio que varias de las ATPasas tipo P muestran un patrón estructural muy similar, a pesar de sus diferencias a nivel de secuencia (Fig 3).

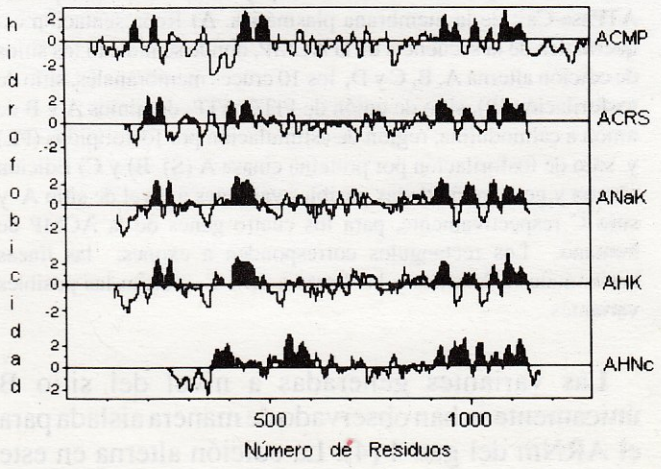


Figura 3. Gráficas de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de cinco ATPasas tipo P, obtenidas por medio del algoritmo de Kyte y Doolitle . Las abreviaturas corresponden a las citadas en la figura 2 (tomado de la referencia 6).

En la figura 4 se presenta un modelo planar de la posibe estructura de la ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática. Este modelo toma como base el propuesto

para la ATPasa-Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico, en conjunto con las predicciones de la estructura secundaria, las evidencias obtenidas por secuencia directa de péptidos, así como la información acumulada de comparar la secuencia de las ACMP con varias ATPasas tipo P. El modelo muestra los 10 dominios o cruces membranales, un gran dominio citoplásmico de estructura alfa-beta entre los cruces membranales 4 y 5, donde se localiza el sitio de fosforilación y el sitio de unión para el ATP. Así mismo, muestra un pequeño dominio citoplásmico entre los cruces membranales 2 y 3, donde se ubica la región que participa en la interacción con los fosfolípidos. Por otro lado, en el extremo carboxilo terminal se localizan los dominios de unión a la calmodulina, el sitio de fosforilación por proteína cinasa C y los sitios de corte por calpaina (Fig 4). El modelo sugiere que la mayor parte de la ACMP se localiza en la cara citoplásmica de la membrana, mientras que en la cara extracelular sólo se encuentran asas muy pequeñas que conectan los segmentos membranales.

A diferencia de otras ATPasas tipo P, una característica sobresaliente de la ACMP es su capacidad de interacción y regulación por calmodulina. Por esta razón, se ha dedicado un gran esfuerzo a tratar de identificar la secuencia o regiones que participan en la interacción con la calmodulina. Por medio de estudios de proteólisis controlada se demostró que el sitio de unión a la calmodulina se localiza dentro de un fragmento de 12 kDa, cercano al carboxilo terminal (2). Al comparar la secuencia de las ACMP con secuencias de diversas enzimas que son reguladas por calmodulina, se han identificado dos dominios de unión a la calmodulina. El dominio A y el dominio B, de aproximadamente 15 residuos cada uno (Fig 4), cuya secuencia presenta una abundancia de aminoácidos básicos y aminoácidos hidrofóbicos, capaces de formar hélices alfa anfifílicas. Es decir, un lado o cara de la hélice es rica en residuos polares (arginina), mientras que la otra cara es rica en residuos hidrofóbicos, rasgo característico de las secuencias de unión a la calmodulina de diversas enzimas (5).

Los trabajos de proteólisis limitada, también sugieren la posibilidad de que la región de unión a la calmodulina puede funcionar como un represor de la actividad de la ACMP, debido a que el corte de esta región provoca una activación de la enzima.

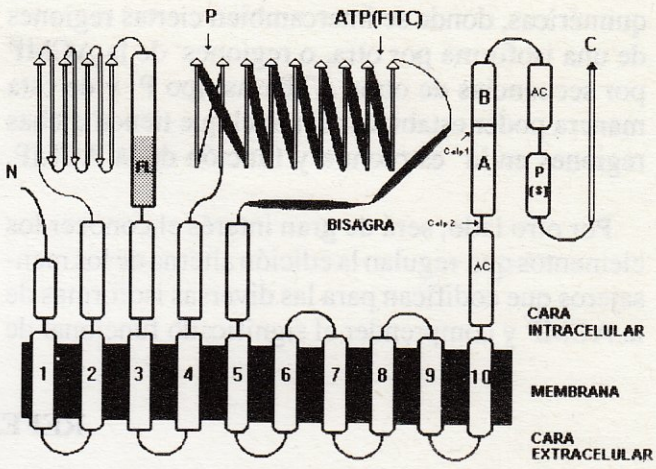


Figura 4. Modelo topológico de la ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática. Los sitios indicados son: sitio de unión a fosfolípidos (FL); sitio de fosforilación (P); sitio de unión a FITC/ATP; dominios A y B de unión a calmodulina; secuencias ricas en aminoácidos ácidos (AC); sitio de fosforilación por proteína cinasa A (PS); sitios de corte por calpaina en ausencia (Calp1) y en presencia de calmodulina (Calp2); 1 a 10, los diez dominios transmembranales; N y C, amino y carboxilo terminales (adaptado de la referencia 4).

Algunos estudios recientes realizados con péptidos sintéticos correspondientes a los dominios de unión a la calmodulina, demuestran que estos péptidos no sólo se unen a la calmodulina, sino también a otra región de la enzima cercana al sitio de interacción con fosfolípidos (3). Esto sugiere la posibilidad de que el dominio de unión a la calmodulina podría doblarse y unirse a una secuencia identificada en el dominio citoplásmico pequeño (ubicado entre los cruces membranales 2 y 3, Fig 4) y de esta manera reprimir la actividad de la enzima. La unión de calmodulina a la enzima evita de esta manera la autoinhibición (3).

VI. PERSPECTIVAS

La determinación de la secuencia de diversas isoformas de la ACMP y el avance en los sistemas de expresión de proteínas *in vitro* han permitido la expresión de esta enzima en células de mamífero (COS-1) y en células de insecto. La expresión de la ACMP en células COS-1 ha demostrado que la afinidad para el calcio depende de la edición alterna; es decir las diversas isoformas tienen una sensibilidad diferente al calcio (15). Esto ofrecerá la posibilidad de realizar un sinnúmero de estudios de mutagénesis dirigida, con la intención de identificar los residuos importantes para la catálisis de esta enzima. Así mismo, abrirá la posibilidad de construir proteínas

quiméricas, donde se intercambien ciertas regiones de una isoforma por otra, o regiones de la ACMP por secuencias de otras ATPasas tipo P y de esta manera poder establecer el papel que tienen dichas regiones en la estructura y función de la ACMP.

Por otro lado, será de gran interés el conocer los elementos que regulan la edición alterna de los mensajeros que codifican para las diversas isoformas de la ACMP y comprender el significado funcional de la gran diversidad de isoformas. Es decir, qué isoformas se expresan realmente en proteína; cuándo se expresan y cuáles son las diferencias funcionales entre cada una de ellas. Todo esto hace suponer que durante los próximos años se darán avances importantes en la caracterización de la ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática y tal vez en un futuro no muy lejano se obtengan evidencias del mecanismo molecular que acopla la hidrólisis del ATP y el transporte de calcio.

REFERENCIAS

1. Rega A F y Garraham P J (1985) The calcium pump of plasma membranes. CRC press, Boca Raton FL; 173 pp.
2. Carafoli E (1987) Intracellular calcium homeostasis. Ann Rev Biochem *56*:395-433.
3. Carafoli E (1992) The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. J Biol Chem *267*:2115-2118.
4. Strehler E E (1991) Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca^{2+} pumps. J Membr Biol *120*:1-15.
5. Shull G E y Greeb J (1988) Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+}-transporting ATPase from rat Brain. J Biol Chem *263*:8646-8657.
6. Verma A K, Liloteo A G, Stanford D R, Wieben E D, Penniston J T, Strehler E E, Fischer R, Heim R, Vogel G, Mathews S, Strehler-Page M A, James P, Vorherr T, Krebs J y Carafoli E (1988) Complete primary structure of a human plasma membrane Ca^{2+} pump. J Biol Chem *263*:14152-14159.
7. Greeb J y Shull G E (1989) Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+}-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. J Biol Chem *264*:18569-18576.
8. Strehler E E, James P, Fischer R, Heim R, Vorher T, Filoteo A G, Penniston J T y Carafoli E (1990) Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium isoforms in the human erythrocyte membrane. J Biol Chem *265*:2835-2842.
9. Heim R, Hug M, Iwata T, Strehler E E y Carafoli E (1992) Microdiversity of human plasma-membrane calcium-pump isoform 2 generated by alternative RNA splicing in the N-terminal coding region. Eur J Biochem *205*:333-340.
10. Brandt P, Neve R, Kammesheidt A, Rhodas R E y Vanaman T C (1992) Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternative spliced form of PMCA4 at cDNA and genomic levels. J Biol Chem *267*:4376-4385.
11. Khan I y Grover A K (1991) Expresion of cyclic-nucleotide-sensitive and insensitive isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} pump in smooth muscle and other tissues. Biochem J *277*:345-349.
12. Stauffer T P, Hilfiker H, Carafoli E y Strehler E E (1993) Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. J Biol Chem *268*:25993-26003.
13. Keeton T P, Burk S E y Shull G E (1993) Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C-termini of plasma membrane Ca^{2+}-ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4. J Biol Chem *268*:2740-2748.
14. Adamo H P y Penniston J T (1992) New Ca^{2+} pump isoforms generated by alternative splicing of rPMCA2 mRNA. Biochem J *283*:355-359.
15. Enyedi A, Verma A K, Heim R, Adamo H P, Filoteo A G, Strehler E E y Penniston J T (1994) The Ca^{2+} affinity of the plasma membrane Ca^{2+} pump is controled by alternative splicing. J Biol Chem *269*:41-43.

REGULACION DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DE FOSFOLIPASA C

Angeles Rangel-Serrano. Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 14-740, México, DF, 07000, México.

RESUMEN

La mayoría de las señales extracelulares que llegan a una célula no penetran al citoplasma; sino que para iniciar sus acciones biológicas requieren de mecanismos de transducción que transmitan la señal al interior de la misma, por medio de segundos mensajeros, que modulan a otros componentes celulares, quienes regulan a su vez distintos procesos como la secreción, la activación del metabolismo o el crecimiento. En muchos casos, la vía que incluye la hidrólisis de fosfoinosítidos es el controlador de estos efectos. La enzima responsable de la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato es la fosfolipasa C, de la cual existen tres isoformas que presentan diferentes modos de regulación. Esta revisión se enfoca en las distintas isoformas de la fosfolipasa C, así como en su regulación por diversos receptores.

PALABRAS CLAVE: fosfolipasa C, hidrólisis de fosfoinosítidos, receptores.

ABSTRACT

Most of the extracelular signals that arrive to a cell do not reach the cytoplasm. And to begin its biological action, they need of a transmembrane signalling mechanism that transmit the signal into the cell interior, through the generation of second messengers. These modulate other cellular components, which in turn regulate different cellular processes such as; secretion, metabolic responses or cell growth. In many cases, the inositide signalling pathway is the major controller of these events. The enzyme responsible for hydrolising the phosphatidylinositol biphosphate is the phospholipase C, from which three isoenzymes exist presenting different ways of regulation. This review is focus on the variuos phospholipase C isoenzymes, as well as in its regulation by different receptors.

KEY WORDS: phospholipase C, phosphoinositides hydrolysis, receptors.

INTRODUCCION

Los organismos multicelulares requieren de señales extracelulares para coordinar las funciones de crecimiento, diferenciación, proliferación y comunicación célula-célula. Algunos de los mensajes son transmitidos a través de la membrana plasmática por mecanismos de transducción que utilizan segundos mensajeros. Los más estudiados son el sistema de la adenilato ciclasa y el que incluye la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2), presente en la membrana plasmática.

En general, los mecanismos de transducción de señales en la célula están compuestos por los siguientes elementos: 1) RECEPTORES de membrana que responden a una gran variedad de moléculas que incluyen hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores e inmunoglobulinas; 2) TRANSDUCTORES de la señal como proteínas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) y que se encuentran acopladas a los receptores; 3) EFECTORES, como la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C (PLC); 4) SEÑALES INTRACELULARES, dadas por los segundos mensajeros, como el AMPc y el inositol trifosfato (IP_3), los cuales, a su vez, activan una cascada de procesos en el interior de la célula.

Un ejemplo clásico de estos sistemas de transducción, es el que produce el AMPc como resultado de un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa. En este caso, la ocupación del receptor por el agonista activa a la adenilato ciclasa, la cual cataliza la síntesis del AMPc, a partir del ATP. El AMPc actúa como segundo mensajero y ejerce su acción por medio de la estimulación de una cinasa A (1), enzima que se encarga de activar o inhibir funciones celulares y o vías metabólicas.

Por su parte, la hidrólisis del PIP_2 se lleva a cabo por una fosfodiesterasa conocida como PLC. La

actividad de esta enzima genera la producción de dos segundos mensajeros, el IP_3 y el 1,2-diacilglicerol (DAG). Mientras que el IP_3, producto soluble, participa en la modulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+}, al movilizarlo de los depósitos intracelulares, el DAG permanece en la membrana plasmática donde activa a la cinasa C (PKC), específica para fosforilar residuos de treonina y serina de proteínas (Fig 1). El Ca^{2+} estimula a su vez, a las cinasas dependientes de Ca^{2+} y o del complejo Ca^{2+}/ Calmodulina; y el DAG puede actuar también como sustrato para generar otros metabolitos activos (2). De esta manera se inician una serie de procesos celulares por medio de este mecanismo de transducción.

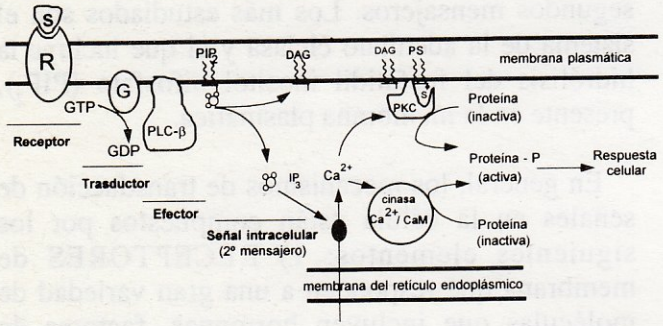


Figura 1. Diagrama de la formación y función de los segundos mensajeros. La unión de la señal (S) al receptor (R) activa a la PLC-β por medio de las proteínas G (G). La PLC cataliza la hidrólisis del PIP_2, lo que genera al IP_3 y el DAG. El IP_3 estimula la liberación del Ca^{2+} intracelular, el cual activa a las cinasas dependientes de Ca^{2+}/ CaM, mientras que el DAG activa a la cinasa C. Este último proceso de activación requiere de la presencia de PS y Ca^{2+}. La fosforilación de varias proteínas por la cinasa dependiente de Ca^{2+}/CaM y la cinasa C, modulan la activación de varios procesos celulares. GTP) trifosfato de guanina; GDP) difosfato de guanina; PIP_2) fosfatidilinositol bifosfato; DAG) diacilglicerol; IP_3) inositol trifosfato; PS) fosfatidil serina; PKC) cinasa C; Ca^{2+}) calcio; CaM) calmodulina; Proteína-P) proteína fosforilada.

Al considerar que la PLC es la enzima clave en la vía de la hidrólisis de fosfoinosítidos, el presente trabajo es una revisión sobre la forma en que se regulan las diferentes isoformas y su papel en la fisiopatología de algunas enfermedades.

ISOFORMAS DE PLC ESPECIFICAS PARA FOSFATIDILINOSITOL

La purificación, así como la caracterización inmunológica y molecular de la PLC, de diferentes tejidos de mamíferos ha revelado la existencia de distintas isoformas de PLC. De la comparación de sus secuencias de aminoácidos han resultado tres tipos: la PLC-β (150 a 154 kDa), la PLC-γ (145 a 146 kDa) y la PLC-δ (85 a 88 kDa), cada una de las cuales, posee más de un subtipo (Tabla I). La homología entre las diferentes isoformas es baja, aunque existe una similitud significativa en dos de sus regiones designadas como **X** (de aproximadamente 170 aminoácidos) y **Y** (de aproximadamente 120 aminoácidos) de aproximadamente 60 y 40%, respectivamente (Fig 2) (3).

TABLA I

CLASIFICACION DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE PLC

Nombre propuesto	Tamaño (kDa)	Receptores que la activan	Proteínas G subunidad (es)	Inhibición por
Familia β:		Receptores		
β1	150-154	acoplados	$G\alpha_q/\alpha_{11}/\alpha_{14}$♣	PKC
β2	134	a proteínas	$G\alpha_{16}$♣, y βγ♠	-
β3	-	G	$G\alpha_q/G\alpha_{11}/G\alpha_{16}/\beta\gamma$	-
β4	-		-	-
Familia γ:		Receptores con		
γ1	145	actividad intrínseca	No se observa	PKC y PKA
γ2	146	de cinasa de Tyr o asociados a una cinasa de Tyr	estimulación por proteínas G	-
Familia δ:		No se conoce el		
δ1	85	tipo de receptor	No se presenta	-
δ2	85	acoplado a esta	estimulación	-
δ3	84	familia de PLCs	por proteínas G	-

♣ subunidades α no sensibles a la toxina *pertussis*; ♠ dímero βγ unido a una subunidad α, sensible a la toxina *pertussis*; Tyr, tirosina; PKC, cinasa C;PKA, cinasa A.

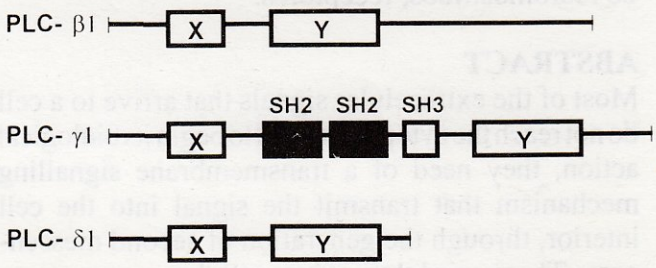


Figura 2. Representación linear de la secuencia deducida a partir del cDNA de las fosfolipasas C-β1, γ1, δ1. Donde X y Y representan los dominios que muestran homología entre las tres isoformas.

Por medio de anticuerpos, se purificaron varios polipéptidos de masa molecular entre 62 y 68 kDa y se identificaron como una isoforma de PLC, a la cual llamaron PLC-α (3). Sin embargo, varios estudios mostraron que el cDNA de la supuesta PLC-α codifica para una proteína tiol-disulfuro-oxirreductasa que carece de actividad de PLC (4). Se ha sugerido que estos polipéptidos posiblemente son fragmentos proteolíticos derivados de otras isoformas de PLC.

Las tres isoenzimas son dependientes de Ca^{2+} y aun cuando la unión del Ca^{2+} a la PLC no se ha demostrado, contienen en la porción carboxilo terminal una región homóloga a los dominios que unen Ca^{2+} en la cinasa C y en la fosfolipasa A_2 (4). Los tres tipos de PLC hidrolizan el fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol monofosfato (PIP) y el PIP_2. La selectividad por el PIP_2 sobre el PI disminuye en el siguiente orden PLC-β1 mayor que PLC-δ1 mayor que PLC-γ1 (3).

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE PLC

Las diferentes isoenzimas son activadas por proteínas G o por fosforilación mediada por una cinasa de tirosina, e interactúan diferencialmente con mecanismos inhibitorios, tales como los mediados por la cinasa de proteína dependiente de AMPc (PKA) y la cinasa C (PKC).

Activación de la PLC-β

Los receptores adrenérgicos, purinérgicos, serotoninérgicos y muscarínicos colinérgicos, entre otros, se encuentran acoplados a proteínas G, las cuales median la señal a las PLC tipo β (5). Por tratamiento con la toxina *pertussis* se infirió la existencia de al menos dos tipos de proteínas G heterotriméricas (constituidas por las subunidades α, β y γ, que intervienen en la activación de la isoforma de PLC-β: proteínas G sensibles o insensibles a esta toxina (3 y 6).

Desde 1985 se sugirió la participación de las proteínas G en el mecanismo de activación de PLC (3 y 4). Sin embargo, la naturaleza de estas proteínas G se conoció recientemente cuando la subfamilia G_q ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{16}$) fue caracterizada por varios laboratorios simultáneamente (4 y 6). Todos los miembros de esta subfamilia son insensibles a la toxina *pertussis*. Las subunidades $G\alpha_q$ y $G\alpha_{11}$ participan en la activación específica de la PLC-β1 y se ha demostrado que no estimulan a las PLC tipo γ1 y δ1 (4, 5 y 7). Otros miembros de la subfamilia G_q como son $G\alpha_{14}$ y $G\alpha_{16}$, también participan en la activación de las PLC-β, como se muestra en la Tabla I. La $G\alpha_{14}$ activa a la PLC-β1, mientras que la $G\alpha_{16}$ activa más eficientemente a la PLC-β2 (4 y 7). Por su parte, la PLC-β3 es activada por $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$ y $G\alpha_{16}$ (7). Se ha reportado que también el dímero βγ, de proteínas G es capaz de activar específicamente a las PLC-β2 y PLC-β3 (Fig 3). La PLC-β4 es un nuevo miembro de las PLC tipo β cuyo gen ha sido recientemente clonado y secuenciado (8), pero para el cual se desconoce su mecanismo de activación.

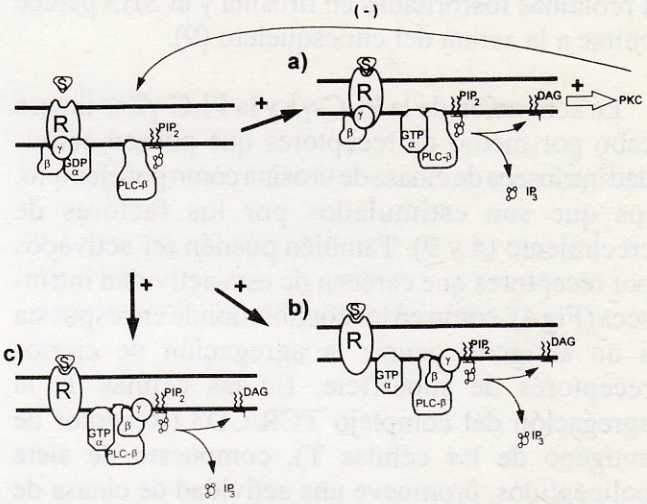


Figura 3. Mecanismos propuestos para la regulación de la PLC-β por proteínas G. La vía utilizada depende del subtipo de PLC-β que se trate. a) Estimulación por la subunidad α de las proteínas G. b) Estimulación por el dímero βγ de las proteínas G. c) Estimulación por la subunidad α y por el dímero βγ de las proteínas G. (+) Activación, (-) Inhibición. S) señal; R) receptor; α, β, γ) subunidades de proteínas G; PIP_2) fosfatidilinositol bifosfato; DAG) diacilglicerol; IP_3) inositol trifosfato; PKC) cinasa C.

En algunas células, la activación de la PLC es regulada por proteínas G sensibles a la toxina *pertussis*. No obstante, $G\alpha_i$ o $G\alpha_o$ no estimulan la actividad de la PLC, por lo que no se ha identificado la subunidad α sensible a la toxina *pertussis*. Una posibilidad es que la activación de la PLC inhibida por la toxina *pertussis* se lleve a cabo por la acción de las subunidades βγ de las proteínas G y no por la subunidad α de estas proteínas.

Como se puede observar, se llevan a cabo interacciones específicas de los diferentes miembros de la familia G_q, así como de las subunidades βγ de las proteínas G, con diferentes efectores de las PLC tipo β. Esta especificidad es importante para generar *in vivo* respuestas únicas de acuerdo a la célula, según sus receptores.

Activación de la PLC-γ

La PLC-γ es modulada por fosforilación mediada por una actividad de cinasa de tirosina (3). Este tipo de PLC posee una secuencia de 400 aminoácidos

entre las regiones X y Y, la cual presenta una homología con varios dominios del oncogen *scr* (SH2 y SH3), conservados en familias de cinasas de tirosina (4). Los dominios SH2 se unen fuertemente a proteínas fosforiladas en tirosina y el SH3 parece unirse a la actina del citoesqueleto (9).

La activación de la PLC-γ1 y la PLC-γ2 se lleva a cabo por medio de receptores que poseen actividad intrínseca de cinasa de tirosina como por ejemplo, los que son estimulados por los factores de crecimiento (4 y 9). También pueden ser activados por receptores que carecen de esta actividad intrínseca (Fig 4), como en leucocitos, donde en respuesta a un antígeno ocurre la agregación de ciertos receptores de superficie. En las células T, la agregación del complejo TCR/CD3 (Receptor de antígeno de las células T), compuesto de siete polipéptidos, promueve una actividad de cinasa de tirosina aún cuando ninguno de los componentes del complejo es una cinasa (9). El receptor del antígeno de las células B para IgM; los receptores FcγRI y Fcγ RII para IgG, en monocitos; así como el receptor FcεRI para IgE, en células cebadas y en basófilos, también estimulan las isoformas, PLC-γ1 y PLC-γ2 (5 y 9).

Los receptores con actividad intrínseca de tirosina y aquellos que carecen de ésta, fosforilan la PLC-γ1 en residuos de tirosina y serina; y promueven su activación (4). La asociación del receptor con la PLC-γ1 es mediada por la interacción de los dominios SH2 de la PLC-γ1 con sitios autofosforilados en tirosina del receptor (4 y 9). Esta unión de los dominios SH2 con el receptor es más fuerte si el receptor está activado y es necesaria para que la PLC-γ1 sea fosforilada en tirosina y como consecuencia sea activada.

Activación de la PLC-δ

Se desconoce el mecanismo de activación para la familia PLC-δ, así como los receptores o transductores a los cuales se encuentran acoplados; sin embargo se ha observado que no se afecta por fosforilación en residuos de tirosina, ni se regula por miembros de la familia G_q, así como tampoco por las subunidades βγ de las proteínas G (4, 5 y 7). Es posible que la regulación de PLC-δ1 sea principalmente a través de cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico.

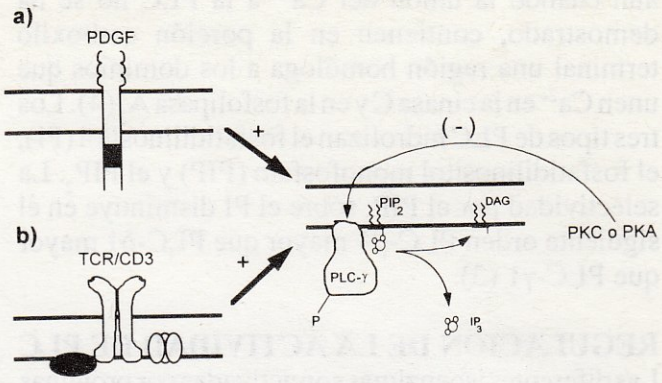


Figura 4. Regulación de la PLC-γ. a) Activación de la PLC-gamma por receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosina. b) Activación por receptores que carecen de actividad intrínseca de cinasa de tirosina. (+) Activación, (-) Inhibición. PDGF) receptor para el factor de crecimiento; TCR/CD3) receptor de los antígenos de las células T; PLC-γ) isoforma de fosfolipasa C; PIP_2) fosfatidilinositol bifosfato; DAG) diacilglicerol; IP_3) inositol trifosfato; PKC) cinasa C; PKA) cinasa A; P) fosforilación en tirosina de la PLC-γ por el receptor; cinasa de tirosina intrínseca del receptor; cinasa de tirosina asociada al recep-tor.

Inhibición de la actividad de PLC

Existen evidencias que sugieren que la activación de la PKC o PKA atenúa la actividad de la PLC acoplada a receptores en ciertos tipos de células, lo que aporta un mecanismo de retroalimentación que limita la magnitud y la duración de la señal al receptor. Los blancos de estas cinasas de serina/treonina no se han identificado en la mayoría de los casos, aunque los posibles blancos incluyen el receptor, las proteínas G, las cinasas y las fosfatasas de tirosina y la propia PLC.

En la PLC-γ1, el mecanismo por el cual la PKC promueve la inhibición de la enzima ya se ha demostrado. En este caso, la fosforilación del receptor en la treonina-654, por la PKC reduce la capacidad de la cinasa de tirosina intrínseca del receptor para fosforilar la PLC-γ1 y previene así su activación (4 y 5). En el caso de la hidrólisis del PIP_2 mediada por la agregación del complejo TCR, el blanco de la PKC y PKA parece ser el residuo de Serina-1,248 de la PLC-γ1 (9), que provoca una alteración en la interacción de la PLC-γ1 con el receptor o con la fosfatasa de tirosina (Fig 4). Las isoenzimas de PKC que median la inhibición por retroalimentación de la PLC en células estimuladas por el antígeno son la PKCα y la PKCε (10).

La PLC-β1 también parece ser blanco de la regulación por la PKC en ciertas células, pero no por la PKA (5). Se ha sugerido que más que un efecto directo sobre la actividad de la enzima, la fosforilación de PLC-β1 por la PKC en residuos de serina puede alterar su interacción con G_q (11) (Fig 3).

Algunos estudios *in vitro* indican además que la PLC-γ1 no fosforilada se inhibe selectivamente en presencia de una concentración micelar de Tritón X-100 (9). Sin embargo, otro detergente como el deoxicolato, no hace diferencia entre la enzima fosforilada y la no fosforilada. Bajo condiciones fisiológicas, la PLC-γ1 también se inhibe en presencia de profilina (proteína soluble que se une a la actina), ya que ésta presenta alta afinidad hacia el PIP_2 y se asocian de 4 a 5 moléculas con este fosfolípido. Sólo la enzima fosforilada puede catalizar la hidrólisis de PIP_2 unido a profilina, lo que sugiere que la profilina puede ser una proteína reguladora de la actividad (9).

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA PLC

Si se considera que la PLC juega un papel importante en la activación de algunas funciones celulares, no es sorprendente que pudiera participar en la fisiopatología de algunas enfermedades. Esto está comenzando a investigarse y se espera lograr una mejor comprensión, conforme el conocimento de las fosfolipasas y su regulación avance. Recientemente, Arteaga y colaboradores (12) reportaron que un alto porcentaje de carcinomas mamarios en humanos presentan, en comparación con el tejido normal, un aumento en los niveles de la PLC-γ1, lo cual potencia la amplificación de la señal.

Por otro lado, en algunos estudios con ratas que presentan hipertensión espontánea se ha observado un aumento en la actividad de la PLC-δ1 en comparación con las ratas normales. Lo que ha sugerido la participación de esta enzima en la hipertensión (13). También se ha asociado la formación de filamentos helicoidales apareados, en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, con una distribución anormal de la PLC-δ1 (5).

En pacientes con *diabetes mellitus*, no dependientes de insulina, se ha observado en hepatocitos, un incremento en la actividad basal de la PLC (14). Por otra parte, en las plaquetas de pacientes diabéticos, dependientes de insulina, la actividad basal de la PLC no presenta alteración, sin embargo, sí se observa una disminución en la actividad estimulada por las proteínas G (15).

La regulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos es un tema que comienza a comprenderse, por lo que se requiere profundizar en el estudio de la activación específica y temporal de las diferentes isoformas o subtipos de PLC que coexistan en una misma célula; así como ahondar también, en la importancia fisiológica que tenga para la célula la presencia y funcionalidad de las diferentes fosfolipasas.

REFERENCIAS

1. Linder E M y Gilman A G (1992) G proteins. Sci Amer *267*(1):36-43.
2. Berridge M J e Irvine R F (1989) Inositol phosphates and cell signaling. Nature *341*:197-205.
3. Rhee S G, Suh P-G, Ryu S-H y Lee S Y (1989) Studies of inosotol phospholipid-specific phospholipase C. Science *244*:546-550.
4. Rhee S G y Choi K D (1992) Regulation of inositol phospholipid-specific. J Biol Chem *267*:12393-12396.
5. Cockcroft S y Thomas G M H (1992) Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. Biochem J *288*:1-14.
6. Blank J L, Ross A H y Exton J H (1991) Purification and characterization of two G-protein that activate the ß1 isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. J Biol Chem *266*:18206-18216.
7. Exton J H (1994) Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. Annu Rev Physiol *56*:349-369.
8. Kim M J, Bahk Y Y, Min D S, Lee S J, Ryu S H y Suh P G (1993) Cloning of cDNA encoding rat phospholipase C-beta-4. A new member of the phospholipase C. Biochem Biophys Res Commun *194*:706-712.
9. Rhee S G (1991) Inositol phospholipid-specific phospholipase C: interaction of the gamma1 isoform with tyrosine kinase. TIBS *16*:297-301.

10. Osawa K, Yamada K, Kazaniets M G, Blumerg P M y Beaven M A (1993) Different isozymes of protein kinase C mediate feedback inhibition of phospholipase C and stimulatory signals for exocytosis on rat RBL-2H3 cells. J Biol Chem *268*:2280-2283.

11. Ryu S H, Kim U H, Wahl M I, Brown A B, Carpenter G, Huang K-P y Rhee S G (1990) Feedback regulation of phospholipase C-ß by protein kinase C. J Biol Chem *265*:17941-17945.

12. Arteaga C L, Johnson M D, Todderud G, Coffey R J, Carpenter G y Page D L (1991) Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in primary human breast carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA *88*:10435-10439.

13. Kato H, Fukami K, Shibasaki F, Homma Y y Takenawa T (1992) Enhancement of phospholipase C-δ1 activity in the aortas of spontaneously hipertensive rats. J Biol Chem *267*:6483-6487.

14. Takker J K, DiMarchi R, MacDonald K y Caro J F (1989) Effect of insulin and insulin-like growth factors I and II on phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate breakdown in liver from humans with and without type II diabetes. J Biol Chem *264*:7169-7175

15. Bastyr E J y Vinik A L (1992) Reduced guanine nucleotide-stimulated polyphosphoinositide specific phospholipase C in platelet hyperaggregation in IDDM. Thromb Res *65*:241-252.

LOS OPIOIDES

Los opioides comprenden un grupo de drogas que son semejantes en sus efectos farmacológicos al opio, motivo por el cual se bautizaron con ese nombre... Pero se preguntará usted ¿qué es el opio? Tal vez no lo relacione con nada; hay quienes lo asocian con ese vegetal verde, de fuerte y aromático sabor llamado apio, pero también hay quienes lo relacionan con las drogas y con el intrigante mundo de la adicción...

La palabra opio deriva del griego ópion que significa "jugo", puesto que el extracto que lleva este nombre es obtenido del jugo de la amapola (*Papaver somniferum*). Este extracto es una de las medicaciones más antiguas que se conocen y fue usado principalmente por su capacidad para quitar el dolor, así como por su efectividad para controlar la diarrea (1. Jaffe J H y Martin W R, 1988, Analgésicos opiáceos y sus antagonistas. En Las bases farmacológicas de la terapeútica, Editores: Goodman-Gilman A; Goodman L S; Rall T W y Murad F. Médica Panamericana, 7ª Edición, México, pp 473-509) (2. Olson G A, Olson R D y Kastin A J, 1991, Endogenous opiates: 1990. Peptides *12*: 1407-1432). Sus propiedades farmacológicas dieron lugar a que el farmacólogo Sydenham en 1680 escribiera: *"Entre los remedios que dios todopoderoso ha dispuesto dar al hombre para aliviar su sufrimiento, ninguno es tan universal y eficaz como el opio"* (1).

El componente principal del opio es la morfina, de la que muchos de nosotros en algún momento hemos escuchado debido a los problemas de adicción que origina, así como por ser la droga más efectiva y más usada para aliviar el dolor. Los efectos de esta droga han fascinado a muchos científicos, quienes se han esforzado en comprender los mecanismos responsables de sus acciones.

En la década de los cuarenta, cuando la morfina fue suficientemente conocida por los químicos, la industria farmacéutica estableció un programa para producir una sustancia que, como la morfina, aliviara el dolor pero que no produjera adicción. A pesar de que hasta la fecha no se ha logrado desligar el efecto adictivo, el resultado de esta producción fue la creación de un arsenal de sustancias, que poseen igual, menor o mayor potencia que la morfina (1 y 2). Algunos de éstos compuestos sintéticos son usados en la clínica para el control del dolor en pacientes con cáncer y en la cirugía, otros más que tienen la capacidad de revertir o eliminar las acciones de los opioides, se emplean para el tratamiento de envenenamiento con estas sustancias (1). Quizá lo más importante ha sido la contruibución de todos ellos al conocimiento de diversos aspectos químicos, biológicos y farmacológicos que se tienen de los opioides hasta el momento.

Hace veinte años se descubrió que existen opioides no sólo en las plantas sino también en los animales. Este tipo de opioides son de origen proteico y a la fecha se conocen aproximadamente doce, los cuales se han clasificado en tres grupos conocidos científicamente como: encefalinas, dinorfinas y endorfinas (2). El hallazgo de estas sustancias ha revelado la existencia de un sistema biológico con base en opioides, sin embargo aún no se conoce cuál es el papel fisiológico que desempeñan en los organismos donde se han encontrado. Pueden participar en numerosos procesos biológicos ya que se ha encontrado que tienen relación con funciones de aprendizaje y de memoria; con la regulación de la temperatura corporal; con las funciones cardiovasculares; con el ejercicio físico e inclusive con la conducta sexual o también participan en algunos estados patológicos por su relación con varios desórdenes mentales.

Los efectos singulares de los opioides se deben a que se unen a moléculas específicas en las células, a las que se les conoce como receptores de opioides. Estos han sido muy estudiados y se sabe que se encuentran en el cerebro, en la médula espinal y en menor grado en otros tejidos.

Los efectos más notables de los opioides en el humano, y con los cuales se está más familiarizado, son los que afectan al sistema nervioso entre los que destacan la disminución o la eliminación del dolor, la

producción de una serie de sensaciones placenteras, la euforia, la reducción de la ansiedad y la inducción del sueño. Las sensaciones placenteras son la causa fundamental del abuso de este tipo de sustancias. Además, desencadenan fenómenos de tolerancia y dependencia física y sicológica con el uso contínuo, que han obligado a que su empleo médico esté restringido legalmente (1 y 2).

A pesar de todas las restricciones en el manejo de estas drogas y según encuestas realizadas en 1982 en los Estados Unidos de América y en la Gran Bretaña, el 1.2% de los adultos entre los dieciocho y veinticinco años de edad, dijeron haber probado la heroína alguna vez en su vida. La heroína es uno de los opioides de uso ilícito más común (1).

Los adictos a los opioides son personas que usan la droga de manera ocasional o crónica con fines diferentes a los médicos. El comienzo del abuso se presenta frecuentemente en aquellos individuos que por experimentar o por "probar" sensaciones nuevas llegan a usarlos y posteriormente siguen con un uso más intensivo, que los conduce a una dependencia de la droga. Los sujetos que caen en este tipo de abuso principalmente son los adolescentes y los adultos jóvenes, con amplio predominio masculino. La mayoría de estos adictos se inician en el uso de estas drogas por medio de otros adictos. Pero la dependencia a estas drogas también afecta en un bajo porcentaje a pacientes cuyo empleo de la droga comienza como tratamiento médico (1 y 2).

Cuando se suspende bruscamente la administración de un opiáceo a un adicto, éste manifiesta una serie de síntomas y conductas anormales que se conocen en conjunto como síndrome de abstinencia. Este síndrome se carateriza al inicio por lagrimeos, sudoraciones y bostezos, posteriormente el adicto pierde el apetito, presenta la llamada "piel de gallina", temblores, náuseas, vómitos, espasmos musculares e intestinales, dolores de los huesos y una intensa angustia. En sujetos muy debilitados se llega a producir postración y finalmente la muerte. En el caso de la morfina y de la heroína, el síndrome de abstinencia aparece de las ocho a las doce horas después de la última dosis y tiene su máxima intensidad entre las cuarenta y ocho a las setenta y dos horas siguientes.

Los efectos tóxicos que los opioides pueden producir a largo plazo son alucinaciones, insuficiencia hepática y cardiaca y depresión del sistema nervioso que puede conducir a la muerte (1).

Como se puede apreciar los opioides resultan fascinantes por los efectos espectaculares que producen en el sistema nervioso, pero han adquirido mayor importancia desde su descubrimiento en organismos diferentes a las plantas. Aunque no se ha determinado el papel que desempeñan, se espera que en un futuro no muy lejano la gran cantidad de estudios que se realizan actualmente en torno a los opioides, permitan conocer mejor la importancia biológica de su presencia.

Araceli Florido Segoviano
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional
Apartado Postal 14-740, México 07000, D F
Teléfono 747 70 00
Fax 756 68 04

A LOS LECTORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

DONATIVO ANUAL 1995

El BEB entra en su décimo cuarto año de publicación y debido a las condiciones económicas imperantes en México, nos permitimos solicitarles de la manera más atenta, el envío de un donativo extracuotas de N$ 100.00 (Cien nuevos pesos) o bien $ 20.00 US dólares, que hará posible continuar con la elaboración y distribución del volumen 14 de nuestro Boletín.

El donativo, puede hacerse mediante un depósito bancario a la cuenta número **1153813-9 de Bancomer**, o de un giro bancario a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C.

En espera de su comprensión y colaboración aprovechamos para enviarles un cordial saludo.

Atentamente
El Comité Editorial

DE NUESTROS LECTORES

ENTRE SIMILITUD Y HOMOLOGIA

Excelente el artículo "Entre similitud y homología" que escribió el Dr. Alberto Huberman en el BEB *14*(2): 18-19, ya que no aborda únicamente un problema aparentemente semántico, sino conceptos muy definidos y de gran importancia en la Biología: el de homología y analogía. Me permito sugerir que se añada una referencia indispensable para completar la discusión, una carta al editor donde once autores de reconocido prestigio abordaron el tema del uso incorrecto (y por desgracia, muy difundido) del término homología:

Reeck G R, de Haen C, Teller D C, Doolittle R F, Fitch W M, Dickerson R E, Chambon P, McLachlan A D, Margoliash E, Jukes T H y Zuckerkand E (1987) Homology in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it. Cell *50:* 667.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo y felicitarlos por el nuevo formato.

Diego González Halphen
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

FE DE ERRATAS

Por un lamentable error la paginación del número de junio de 1995 del BEB , Vol *14* No 2, se inició con la página 1 en vez de hacerlo con la página 35. Este error afecta las citas de los números 1 y 2 del volumen 14, ya que ambos números tienen las mismas páginas.

Por esta razón y para evitar confusiones en la localización del trabajo, es necesario que los artículos sean citados de la siguiente forma:

- Morales Montor J (1995) Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parásitos. BEB *14*(1): 5-11.

- Fernández-Velazco DA (1995) Plegamiento de proteínas. BEB *14*(2): 5-10.

Atentamente
El Comité Editorial

DONACIONES E INTERCAMBIOS

DONACION DE EJEMPLARES DEL PLANT PHYSIOLOGY

En nuestro laboratorio contamos con una colección personal de la revista Plant Physiology que cubre el período de 1970 a 1992, la cual deseamos donar a una institución que pudiera estar interesada. La colección está prácticamente completa, contiene 257 ejemplares y sólo faltan los correspondientes a los años de 1979 y 1990, así como los números 1, 2 y 1 de los años de 1974, 1977, 1991, respectivamente.

Para que la donación se pueda llevar a cabo, la institución interesada deberá cubrir el importe postal, el cual es de aproximadamente $ 385.00 Dolares USCy. Esta tarifa corresponde al correo terrestre de Estados Unidos de América a México y es la más económica; esta cantidad se calculó con base en el peso y costo del envío de uno de los ejemplares más pesados. El peso aproximado de la colección completa es de 240 kg.

Las instituciones interesadas comunicarse con:

Raúl Arredondo-Peter. Department of Biochemistry
The Beadle Center, University of Nebraska-Lincoln
Lincoln, NE 68588-0664, USA.
Teléfono: (402)472-6808, Fax: (402)472-7842
Correo electrónico: ra@unlinfo.unl.edu

IX CONGRESO
DE BIOENERGETICA Y BIOMEMBRANAS
DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA

a realizarse del 12 al 16 de noviembre de 1995
en el Centro Vacacional Metepec del IMSS en Puebla

Se aceptará un máximo de dos contribuciones orales por cada miembro numerario; contribuciones adicionales serán consideradas para ser presentadas en posters. En esta ocasión, cada sesión terminará con una mesa redonda integrada por comentaristas asignados para fomentar el espíritu crítico y de discusión.

Las contribuciones serán agrupadas dentro de los siguientes temas generales:

1. ATPasas y acoplamiento energético
2. Transporte de electrones
3. Transporte a través de membranas
4. Dinámica de lípidos de membrana
5. Transducción a través de membrana
6. Fotosistemas

Los resúmenes serán recibidos a partir del día 7 de agosto, y la fecha límite será el 11 de agosto. Las instrucciones y formatos podrán ser recogidos en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM con la Sra Teresa del Castillo.

COMITE ORGANIZADOR

Dr Víctor Calderón
Tel 754-02-00 ext 52-25
Fax 754-68-04

Dr Alejandro Zentella
Tel 622-56-03
Fax 616-24-19

Dra Patricia del Arenal
Tel 623-21-69
Fax 622-56-11

VII CONGRESO NACIONAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS

Y

PRIMER SIMPOSIUM MEXICO-ESTADOS UNIDOS SOBRE AGROBIOLOGIA, FISIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA DE CULTIVOS IMPORTANTES PARA LA AGRICULTURA MEXICANA

Del 5 al 9 de noviembre de 1995
Cocoyoc, Morelos

Organizado por: la Sociedad Mexicana de Bioquímica, el Instituto de Biotecnología, UNAM y la Facultad de Química, UNAM.

PROGRAMA CIENTIFICO: TEMAS DE LOS SIMPOSIA

- **Asociaciones Simbióticas y Fijación de Nitrógeno**
- **Mecanismos Moleculares de Desarrollo**
- **Respuestas de las Plantas Bajo Estrés**
- **Transducción de Señales**
- **Regulación de Procesos Metabólicos**
- **Respuesta a Patógenos**

Informes: Dra Alejandra Covarrubias
Instituto de Biotecnología. UNAM
Apdo Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos 62271
Tel (73) 114700 Fax (73) 139988 o (73) 172388
Correo electrónico: crobles @pbr322.ceingebi.unam.mx

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 el procesador 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.

BEB 95 Vol 14 Núm 3 Septiembre de 1995

CONTENIDO

EDITORIAL

DE EQUILIBRIOS, INTERCAMBIOS Y POSIBILIDADES DE DESARROLLO
Raúl Arredondo Peter 87

ARTICULOS

DAÑO POR REPERFUSION EN EL MIOCARDIO
José Francisco Téllez Zenteno 89

AVANCES Y PERSPECTIVAS EN LA CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMATICA
Juan Diego Santiago García 96

REGULACION DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DE FOSFOLIPASA C
Angeles Rangel Serrano 103

OTRAS COMUNICACIONES

LOS OPIOIDES
Araceli Florido Segoviano 109

A LOS LECTORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA
El Comité Editorial. 111

FE DE ERRATAS
El Comité Editorial 111

DE NUESTROS LECTORES
ENTRE SIMILITUD Y HOMOLOGIA 111

DONACIONES E INTERCAMBIOS
COLECCION DEL PLANT PHYSIOLOGY 111

AVISOS

IX CONGRESO DE BIOENERGETICA Y BIOMEMBRANAS DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA, A C 112

VII CONGRESO NACIONAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS Y PRIMER SIMPOSIUM MEXICO-ESTADOS UNIDOS SOBRE AGROBIOLOGIA, FISIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA DE CULTIVOS IMPORTANTES PARA LA AGRICULTURA MEXICANA 113

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA 114