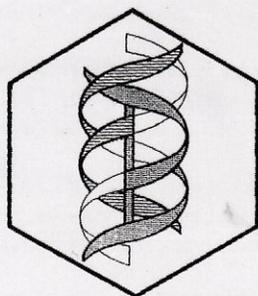
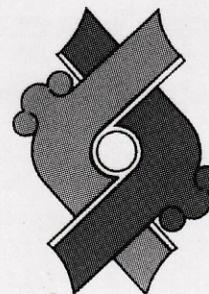


BEB 2001

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la
**ASOCIACIÓN MEXICANA DE
PROFESORES DE BIOQUÍMICA, AC**



**SOCIEDAD MEXICANA DE
BIOQUÍMICA, AC**

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

COMITÉ 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

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES

SOCORRO CONCEPCIÓN DURÁN VARGAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GRACIELA MEZA RUIZ

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

RAFAEL MORENO SÁNCHEZ

Instituto Nacional de Cardiología
"Dr. Ignacio Chávez"

ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

JORGE JOEL REYES MÉNDEZ

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES ASOCIADOS

EDMUNDO CHÁVEZ COSÍO

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

MARINA GAVILANES RUIZ

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ELIZABETH LANGLEY McCARRON

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

JAIME MAS OLIVA

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ASISTENTE EDITORIAL

MARIVEL ROJAS GARCÍA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

MARÍA DE LOS ANGELES BOFFILL CÁRDENAS

Facultad de Ciencias Médicas
Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba

ALMA LETICIA BORBOA OSUNA

Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Sinaloa

JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO

Instituto de Ciencias Básicas "Victoria de Girón"
Instituto Superior de Ciencias Médicas, La Habana, Cuba

GUADALUPE OLIVA

Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros, Tamps.

KATERINA LIRA RUÁN

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor.

ARMANDO FRANCISCO VARGAS ALBORES

Biotecnología Marina
Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo de Sonora

KARLA CARVAJAL AGUILERA
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

RAÚL MIGUEL COVIÁN
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

SILVIA DEVARAS RAMOS
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

JOSÉ EDGARDO ESCAMILLA MARVÁN
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

OSCAR FLORES HERRERA
Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CECILIA GARCÍA PÉREZ
Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CARLOS GÓMEZ LOJERO
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

LUIS GONZÁLEZ DE LA VARA
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

RICARDO JASSO CHÁVEZ
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

HERMINIA LOZA TAVERA
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

BLAS LOTINA HENNSEN
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

GUADALUPE MALDONADO MERCADO
Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

JOSÉ LUIS MOLINARI SORIANO
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

FERMÍN PACHECO MOISÉS
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

JUAN LUIS RENDÓN GÓMEZ
Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

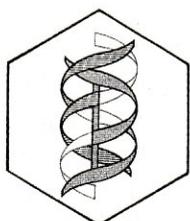
HORACIO REYES VIVAS
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

LUIS HUMBERTO SILVEIRA TORRE
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

MARÍA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SALVADOR URIBE CARVAJAL
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México



Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, AC

Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina,
UNAM



Facultad de Medicina,
UNAM

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (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 **PERIÓDICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,500 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP09-0403; UNAM-Depto de Bioquímica y Facultad de Medicina.

El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente la del Comité Editorial.

EDITORIAL

VIGÉSIMO ANIVERSARIO

Al cumplir el Boletín de Educación Bioquímica (BEB) 20 años de publicación ininterrumpida, acuden a la mente una gran cantidad de recuerdos, entre otros, los relacionados con la emoción de los primeros editores al tener en sus manos un nuevo número del BEB, o los tropiezos que se tuvo en ocasiones para conseguir material para armar el siguiente número, o bien, las cartas de felicitación y parabienes de muchos de los primeros receptores o de reclamo de otros, cuando el Boletín no llegaba oportunamente a sus manos. Viene también a la memoria el recuerdo de la aceptación con la que fue recibido el Boletín por la comunidad bioquímica del país y de algunas universidades hispano-americanas.

Se recuerda lo significativo que han sido los diferentes apoyos, tanto académicos como económicos, con los que el BEB ha contado desde el principio. Es de justicia hacer mención que el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM ha sido la sede permanente de la revista y ha ofrecido incondicionalmente instalaciones, servicios y personal requeridos para hacer posible la publicación; por otro lado, no podemos ignorar el apoyo ofrecido por otras instancias universitarias como son la Dirección de la Facultad de Medicina, el Sistema de Universidad Abierta, la Secretaría General de la UNAM, así como el apoyo económico que en los primeros años otorgó el CONACYT; además de las contribuciones de socios o suscriptores.

Por otro lado, es importante mencionar la entrega de cada uno de los profesores que en diferentes épocas han dado su tiempo y dedicación, participando como autores, editores, coordinadores, revisores o corresponsales. También viene a la mente la alegría que sentimos

cuando se logró la constitución de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. y el compromiso social adquirido, ya que en el Artículo Cuatro de sus Estatutos, en el inciso i) dice: "La Asociación tiene por objeto asumir la responsabilidad de la publicación del Boletín de Educación Bioquímica (BEB), revista de difusión, publicada trimestralmente y fundada en 1982, que será su órgano oficial de comunicación".

A 20 años del inicio de la publicación del Boletín de Educación Bioquímica y echar la vista atrás, vemos que los objetivos planteados al principio se han cumplido, que se ha hecho un esfuerzo por mantener la calidad del contenido, la periodicidad en su aparición y una distribución relativamente amplia. La Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A. C. inició en el año 2000 un programa de vinculación con la Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C. con el fin de establecer lazos académicos entre ambas asociaciones y sumar esfuerzos para la enseñanza y difusión de la bioquímica.

Lo que se ha logrado hasta ahora genera el compromiso de redoblar esfuerzos para mantener la calidad de su publicación que esté acorde con las expectativas de sus lectores y para que cubra eficientemente la difusión de artículos de actualidad e interés entre la comunidad bioquímica nacional e hispano-americana. La necesidad por el conocimiento debe satisfacerse con una mayor comunicación entre educadores y educandos, investigadores y discípulos, profesores y estudiantes, mediante la publicación de artículos de difusión, con información reciente y relevante en temas de actualidad, que apoyen al proceso educativo. Con relación a esto, últimamente en el BEB se han publicado artículos firmados

por estudiantes de posgrado, mecanismo que ayuda a esta población, a su desarrollo en la comunicación de sus conocimientos al realizar ensayos y hacer una discusión crítica de temas específicos. Aunque esta posibilidad ha sido poco explotada, los resultados que se han tenido son satisfactorios ya que el estudiante se ve obligado a tener una redacción clara e integrar sus ideas; de esta manera, el BEB contribuye en la formación académica del estudiante.

El Boletín de Educación Bioquímica ha cumplido, hasta ahora, con un papel histórico gracias al trabajo de autores, editores, coordinadores, revisores, corresponsales, lectores y patrocinadores. Como una siguiente etapa dentro del proceso evolutivo, el Comité Editorial del Boletín de Educación Bioquímica ha decidido, con el inicio del volumen 21, dar dos pasos importantes en la realización de nuestra publicación: por un lado, hacer los trámites pertinentes para dejar de ser boletín y pasar a ser revista y, por otro,

aumentar la cantidad de artículos publicados por número. Esto permitirá tener más oportunidad de interacción con la comunidad bioquímica, tanto a nivel de contribuciones como del cuerpo editorial.

Hacemos votos para que cada vez sea mayor el número de miembros de la comunidad académica y científica de nuestro campo que se interese por participar en el BEB, ya que éste es nuestro órgano de comunicación.

José Víctor Calderón Salinas,
Editor en Jefe

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados,
Instituto Politécnico Nacional

Yolanda Saldaña Balmori,
Coordinador Editorial Fundador
Facultad de Medicina,

Universidad Nacional Autónoma de México

ASTROCITOS, ÓXIDO NÍTRICO Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Ana Gadea¹ y Ana María López Colomé^{1,2}. ¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM y ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, 04510, México, D.F., México. Tel.: 5622-5617. Fax: 5622-5607. Correo electrónico: acolome@ifisiol.unam.mx

Recibido: 22 de febrero de 2001. Aceptado: 22 de mayo de 2001.

RESUMEN

El daño en la cadena respiratoria mitocondrial es un factor importante en la patogénesis de ciertas enfermedades neurodegenerativas como la de Parkinson, la de Alzheimer y la esclerosis múltiple. Cada vez existe mayor evidencia que sugiere que la formación inadecuada o excesiva de óxido nítrico y peroxinitritos juega un papel fundamental en dichas enfermedades. Dada la naturaleza difusible de estas moléculas, es posible que su producción por los astrocitos esté relacionada con el daño mitocondrial observado en las neuronas en estados patológicos. Esta revisión pretende proporcionar evidencia que apoye la idea de que los astrocitos, el tipo celular predominante en el sistema nervioso central adulto, participan activamente en los procesos de neurodegeneración a través de la producción de óxido nítrico.

PALABRAS CLAVE: Óxido nítrico, glía, peroxinitritos, neurodegeneración, daño mitocondrial.

ABSTRACT

A role for mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases is gaining increasing support. Mitochondrial alterations might be linked to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis. There is also growing evidence which implicates inappropriate or excessive formation of nitric oxide and peroxynitrites in these disorders. Astrocytic production of these diffusible molecules could be an important cause for neuronal mitochondrial damage observed in pathological conditions. This review gathers experimental evidence supporting the idea that astrocytes participate in neurodegenerative processes through the production of nitric oxide.

KEY WORDS: Nitric oxide, glia, peroxynitrites, neurodegeneration, mitochondrial damage.

INTRODUCCIÓN

Las células gliales constituyen más de la mitad del volumen total del cerebro y superan en número a las neuronas, a pesar de lo cual han atraído poco la atención de los neurofisiólogos desde su descripción por Virchow en 1846. Su propuesta de que las células gliales no son más que un "pegamento nervioso" siguió siendo, hasta hace pocos años, el punto de vista de muchos neurofisiólogos; sin embargo, en los últimos años se ha progresado considerablemente en la comprensión de la fisiología glial y las interacciones glía-neurona lo cual ha llevado a un replanteamiento de los mecanismos que subyacen al funcionamiento del sistema nervioso.

Dos funciones muy importantes de las células gliales, su papel en la migración neuronal y el mantenimiento de la homeostasis iónica, se aceptan generalmente y se relacionan con un papel pasivo de las células gliales durante el desarrollo del cerebro y en el procesamiento de la información. Sin embargo, el descubrimiento de que la glía expresa receptores para neurotransmisores y neuromoduladores, y de que libera sustancias neuroactivas, ha llevado a postular un papel activo de las células gliales en el funcionamiento del cerebro, tanto en condiciones fisiológicas como en estados patológicos.

Las células de la neuroglía de los vertebrados se clasifican en dos grandes grupos: la microglía y la macroglía. La microglía está formada por células fagocíticas de origen mesodérmico que se movilizan después de una lesión o infección. Las células de la macroglía, de origen ectodérmico, se dividen en tres grupos: los oligodendrocitos, las células de Schwann y los astrocitos. El papel de la microglía como mediador de los padecimientos inflamatorios y degenerativos en el sistema nervioso está bien establecido, sin embargo, la participación de los astrocitos ha re-

cibido menor atención. Esta revisión pretende examinar la evidencia que apoya la idea de que los astrocitos, el tipo celular predominante en el sistema nervioso central adulto, participan activamente en los procesos de neurodegeneración implicados en ciertas enfermedades neurológicas, a través de la producción de óxido nítrico (ON).

En el sistema nervioso central (SNC), el ON tiene varias funciones bioquímicas como son la inducción de la síntesis de GMP cíclico (cGMP) por activación de la guanilato ciclasa soluble, y la regulación de la enzima glicolítica, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. El ON, producido por la neurona postsináptica, difunde a la terminal presináptica donde modula la liberación de neurotransmisor a través de la síntesis de cGMP y la regulación de canales iónicos, así como de las proteínas involucradas en la fusión de las vesículas (Figura 1). Más aún, parece estar implicado en procesos fisiológicos como la percepción al dolor, la plasticidad sináptica y el aprendizaje (1).

El ON es un radical libre con vida media corta, debido a que reacciona con una gran cantidad de componentes químicos intracelulares. La reacción del ON con el radical superóxido (O_2^-) resulta en la formación del anión peroxinitrilo ($ONOO^-$), que es altamente citotóxico. Esta reacción se ve favorecida por la capacidad del ON de competir con la enzima superóxido dismutasa por el superóxido. La toxicidad asociada con el ON puede evitarse atrapando al radical superóxido, por lo que la formación de $ONOO^-$ se considera un factor importante en procesos de daño celular.

El ON se sintetiza por varias isoformas de la sintetasa del óxido nítrico (NOS, de nitric oxide synthase), que cataliza la conversión de arginina a citrulina (Figura 2). En general, las neuronas producen óxido nítrico por la activación, dependiente de calcio, de la NOS neuronal (nNOS) que se expresa de manera constitutiva en estas células. En cambio, la síntesis de ON por las células gliales es independiente de calcio

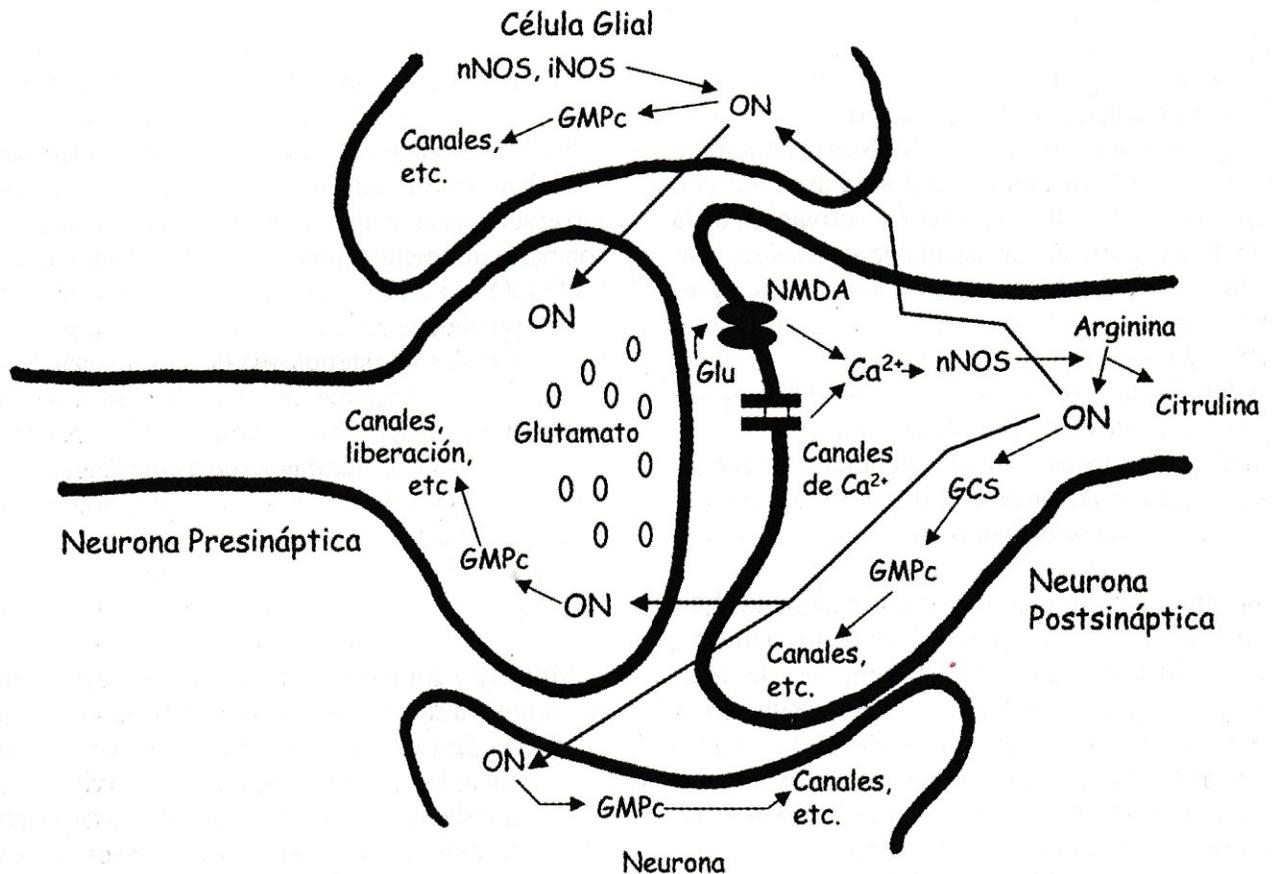


Figura 1. El óxido nítrico (ON) sintetizado en la neurona postsináptica difunde a través de las membranas y puede actuar tanto en la neurona presináptica como en neuronas y células gliales vecinas. Las células gliales también sintetizan ON (ver texto). NOS, Sintetasa del Oxido Nítrico; GSC, Guanilato Ciclasa Soluble; GMPc, Guanosin monofosfato cíclico.

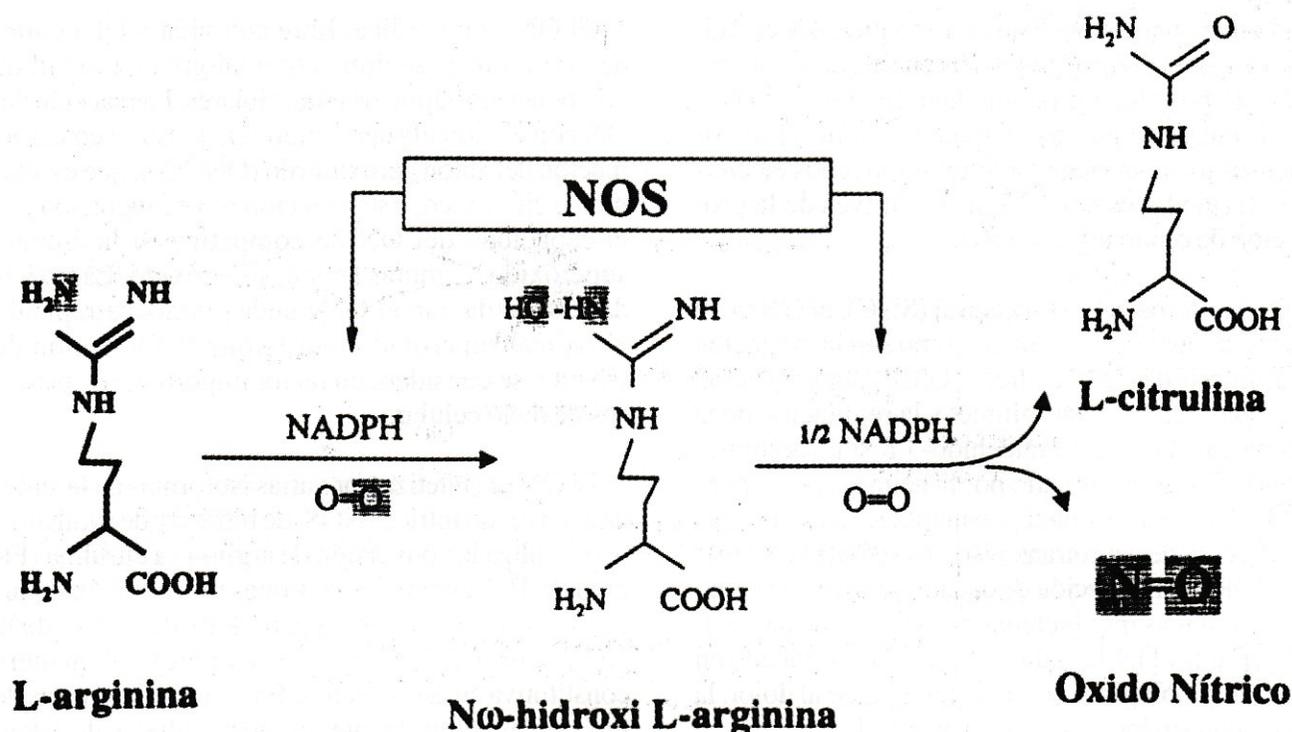


Figura 2. Representación esquemática de las reacciones catalizadas por la sintetasa del óxido nítrico (NOS).

y requiere de la inducción de la NOS inducible (iNOS), es decir, de la síntesis "de novo" de la enzima. Una tercera isoforma de la NOS es la endotelial (eNOS), también descrita en el SNC y asociada con el sistema vascular del cerebro. La activación de la nNOS forma parte de la cascada de señales acoplada a la activación de receptores neuronales a glutamato que lleva a la formación de GMP cíclico (cGMP). En los astrocitos, sin embargo, la inducción de la iNOS está asociada a condiciones patológicas (Figura 3). Existe evidencia de que los astrocitos también sintetizan ON de manera dependiente de calcio, llevando a la formación de cGMP, pero el papel fisiológico de esta vía se desconoce (1).

Está ampliamente reconocido que el desequilibrio en el metabolismo energético es un factor determinante en la patogénesis de ciertas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson y la esclerosis múltiple, a través de la formación inadecuada o excesiva tanto de ON como de peroxinitritos. Aunque en condiciones normales el ON desempeña funciones importantes en el SNC, la pérdida de control en la síntesis de ON y ONOO⁻ puede alterar la cadena respiratoria mitocondrial de las neuronas. En el cerebro, la susceptibilidad de los diferentes tipos

celulares al ON y a los ONOO⁻ depende de factores como la concentración intracelular de glutatión y la habilidad de incrementar el flujo glicolítico en respuesta al daño mitocondrial. A este respecto, se ha demostrado que en condiciones de cultivo las neuronas son particularmente vulnerables a los efectos del ON y ONOO⁻ en comparación con los astrocitos, los cuales pueden generar altas concentraciones de ON y ONOO⁻. La resistencia de las células gliales al estrés oxidativo parece deberse al sistema antioxidante del glutatión, que es altamente eficiente en estas células. Dada la naturaleza difusible del ON y del ONOO⁻, es posible que su formación por los astrocitos sea una de las principales causas del daño mitocondrial observado en las neuronas en estados patológicos.

Murphy y colaboradores (2) fueron los primeros en demostrar que los astrocitos sintetizan cantidades pequeñas de ON en respuesta a compuestos que incrementan la concentración de calcio intracelular como la bradicinina, el ionóforo A-23187, y agonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato y de noradrenalina. En congruencia con estos resultados, posteriormente se demostró que la activación de la forma constitutiva, dependiente de calcio, de la

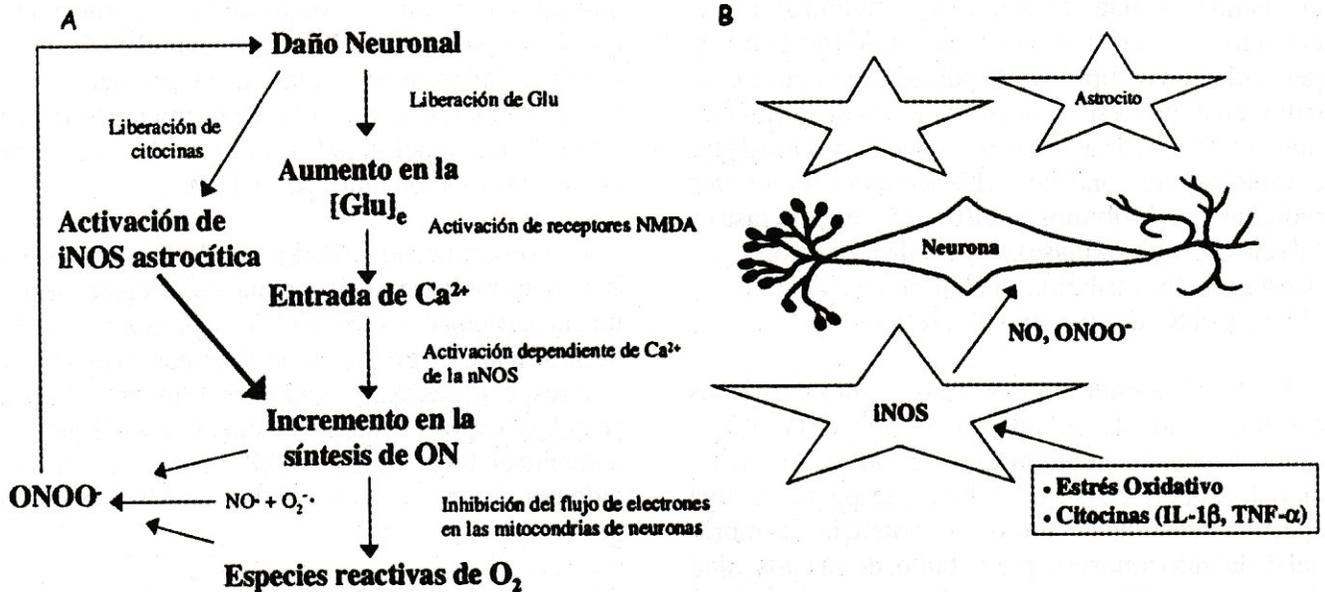


Figura 3. A) Vías de síntesis de ON y ONOO⁻ en astrocitos y neuronas en respuesta al daño neuronal. B) Como respuesta al daño neuronal, los astrocitos se activan (ver texto). Esta activación resulta en la inducción de la iNOS y otros genes. La inducción de la iNOS astrocítica está asociada a condiciones patológicas.

nNOS incrementa la concentración de cGMP en estas células. Varias citocinas como el interferón- γ (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o la interleucina-1 β , así como el lipopolisacárido (LPS) derivado de bacterias Gram-negativas, también estimulan la síntesis de cGMP a través de la inducción de la iNOS tanto en astrocitos en cultivo primario como en la línea celular de glioma C6. La actividad de la iNOS está determinada tanto por el tipo y concentración de citocinas, como por la activación de receptores para factores de crecimiento con actividad de tirosina cinasa. Este efecto se inhibe por el cAMP, la interleucina-4, la interleucina-10 y el corticoesteroide antiinflamatorio sintético dexametasona (3).

Como respuesta al daño neuronal, los astrocitos se activan, sufren hipertrofia e/o hiperplasia, así como un incremento en la actividad metabólica. En este fenómeno, denominado gliosis, participan varias citocinas. En condiciones de isquemia cerebral, se observa una reorganización de las uniones estrechas entre los astrocitos; la expresión de las proteínas que forman esta unión, como la conexina 43, disminuye en el foco del daño y aumenta en los astrocitos vecinos, lo que podría limitar la gliosis reactiva a las áreas isquémicas. En apoyo de esta hipótesis, la endotelina-1, inhibidor de la permeabilidad de las uniones estrechas, se sobreexpresa en astrocitos reactivos; además, se ha

reportado que el tratamiento con LPS (que induce a la iNOS) inhibe la permeabilidad de las uniones estrechas a través de un mecanismo mediado por radicales libres. Estos hallazgos sugieren que las uniones estrechas podrían participar en la patología de los padecimientos neurodegenerativos (revisado en 4).

Existe evidencia de que el ON derivado de la inducción de la iNOS en astrocitos incrementa la muerte neuronal. La vulnerabilidad de las neuronas a la sobreactivación de los receptores de glutamato aumenta en presencia de astrocitos reactivos (5) y la inducción de la expresión astrocítica de la iNOS por citocinas en cultivos mixtos de astrocitos y neuronas, provoca daño neuronal (6). Asimismo, los niveles de ATP disminuyen en neuronas cultivadas en presencia de astrocitos que expresan iNOS. Experimentos recientes han demostrado que el pretratamiento de astrocitos en cultivo con IFN- α/β evita el daño ocasionado por ON en la cadena respiratoria mitocondrial neuronal, lo que sugiere que el ON procedente de astrocitos podría ser el agente causal del mismo (7), mediante la formación del anión peroxinitrito.

Aunque la participación del ON en la neurotoxicidad se ha fundamentado, los mecanismos moleculares que subyacen a la muerte neuronal provocada por

el mismo no se han esclarecido a profundidad. Existe consenso en que tanto el daño al ADN, como la peroxidación de lípidos y la pérdida energética contribuyen al proceso. Las alteraciones de la función mitocondrial podrían derivar de la inactivación de los complejos mitocondriales II (succinato-ubiquinona reductasa), III (ubiquinol-citocromo c reductasa) y IV (citocromo c oxidasa) observada en neuronas expuestas al ON, atribuida a la interacción del ON con el Fe^{2+} y el S^{2-} de su grupo prostético (7).

En las mitocondrias de diversos tejidos expuestos a agentes oxidantes se observa la agregación de ciertas proteínas de la membrana interna, con la formación de un poro de permeabilidad inespecífica, cuya apertura ocasiona la pérdida del potencial membranal de la mitocondria y, por lo tanto, de su capacidad de sintetizar ATP y capturar calcio, alteraciones que pueden conducir a la necrosis. La formación de este poro es un evento temprano en la muerte celular programada o apoptosis, ya que su apertura conlleva la liberación del citocromo c, que actúa como una señal proapoptótica. La formación de este poro se ha atribuido a: a) la formación de puentes disulfuro entre las proteínas de la membrana interna mediada por ONOO⁻; b) la peroxidación de lípidos por el ONOO⁻ con la consecuente alteración de la permeabilidad membranal y c) la inhibición de la cadena respiratoria inducida por la interacción del ONOO⁻ con los grupos hemo.

En el SNC, se ha demostrado que el ON estimula la exocitosis de neurotransmisores contenidos en las vesículas sinápticas, probablemente a través de la S-nitrosilación de las proteínas responsables de la fusión de la vesícula con la membrana plasmática (1). De manera coincidente, la liberación excesiva de glutamato induce la muerte apoptótica de células granulares del cerebelo debido a la estimulación de la síntesis de ON (8). En este modelo de apoptosis es clave la activación de los receptores de glutamato del tipo NMDA y el incremento consecuente de la concentración intracelular de Ca^{2+} , que lleva a la formación de ON/ONOO⁻. Este mecanismo podría exacerbarse por la producción de un exceso de ON por la glía.

Los estudios enfocados al papel del ON en los procesos de degeneración en el sistema nervioso no han podido determinar aún si la neurotoxicidad oca-

sionada por el daño mitocondrial es un proceso necrótico o apoptótico. Mientras que el daño mitocondrial severo provoca la muerte por necrosis, el proceso apoptótico inducido por el glutamato requiere para su activación del suministro de ATP procedente de la función mitocondrial (9).

En la enfermedad de Parkinson, la de Alzheimer, la esclerosis múltiple y la isquemia, en las cuales se postula la participación de la iNOS, se presenta un incremento en la concentración de citocinas en el SNC. A este respecto, se ha observado en animales a los que se induce experimentalmente encefalitis alérgica, un aumento en la expresión del ARNm de la iNOS inducido por citocinas, paralelo a la gravedad de los rasgos clínicos.

En la enfermedad de Alzheimer se produce un exceso de radicales libres (10) que podrían derivar de la sobreexpresión específica del factor derivado de la glía S100B demostrada en este padecimiento. La producción de ON mediada por S100B podría constituir un factor importante en la patogénesis de la enfermedad, dado que esta proteína induce a la iNOS de astrocitos en cultivo y puede ocasionar la muerte neuronal mediada por ON en cultivos mixtos de glía y neuronas. Asimismo, está demostrado que la proteína β -amiloide, que forma los depósitos amiloides característicos del Alzheimer, activa a la iNOS en astrocitos, así como a la NOS en una línea de neuroblastoma. En los primeros, dicha activación está mediada por la IL-1 β y el TNF- α (11). En tejido cerebral post mortem de pacientes con Alzheimer, se demostró que los residuos de tirosina de las proteínas estaban nitrosilados, lo cual se corroboró con la identificación de nitrotirosina en el fluido cerebrospinal (12).

En la enfermedad de Parkinson, que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo, existe también una producción excesiva de ON en la glía; el estrés oxidativo resultante podría relacionarse con la cascada de eventos que lleva a la muerte neuronal. Esta relación podría darse a través del aumento en la expresión de la iNOS que ha sido demostrado en las células astrocíticas que acompañan a las neuronas dopaminérgicas afectadas en esta enfermedad. La MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) produce un daño en estas neuronas similar al que se presenta en la enfermedad de Par-

kinson y se acompaña de la inducción de la iNOS y gliosis en la pars compacta de la sustancia nigra (13). La resistencia a la MPTP en ratones mutantes que carecen de iNOS apoya la idea de que esta enzima interviene tanto en el proceso neurodegenerativo causado por MPTP, como en la enfermedad de Parkinson.

En la esclerosis amiotrófica lateral (ALS), que se caracteriza por la pérdida de neuronas motoras, se ha encontrado una clara correlación entre el estrés oxidativo y la muerte selectiva de las mismas. En la forma hereditaria de esta enfermedad se encontraron mutaciones en la enzima superóxido dismutasa (SOD), que tiene una función antioxidante a través de la eliminación del radical superóxido. Por otra parte, la forma esporádica se ha relacionado con alteraciones en la concentración y/o el transporte de glutamato y el consecuente daño por estrés oxidativo en las motoneuronas. Ratones transgénicos con una SOD mutante desarrollan un síndrome con las características de la ALS, acompañado de gliosis progresiva así como de la inducción de la iNOS, que no se expresa normalmente en las células gliales (14). En este modelo, la expresión de la iNOS es concomitante a la degeneración específica de la médula espinal. En este mismo sistema se demostró que la interleucina-1 β aumenta la sobrevivencia de los mutantes al inhibir la inducción de la iNOS glial por citocinas. Con base en los resultados mencionados, se ha propuesto que la muerte inicial de motoneuronas libera factores quimiotácticos y citocinas que llevan al desarrollo de gliosis, inducción de la iNOS, síntesis de especies reactivas de ON y, como consecuencia, al estrés oxidativo y a la progresión de la neurodegeneración.

Los resultados aquí analizados señalan claramente la participación activa de los astrocitos en la degeneración que acompaña a diversos padecimientos del sistema nervioso. Los astrocitos poseen receptores membranales para neurotransmisores como el glutamato, el ácido γ -aminobutírico (GABA), la acetilcolina y la norepinefrina, así como para numerosos péptidos y factores de crecimiento (15), a través de los cuales perciben la actividad presináptica de las neuronas. La estimulación de estos receptores, a su vez, puede regular las concentraciones iónicas intracelulares, la síntesis de segundos mensajeros y procesos de fosforilación e influir tanto en la morfología, como en las funciones características de la glía. A tra-

vés de estos mecanismos, la glía responde al daño neuronal con alteraciones en su fisiología. La producción excesiva de ON por los astrocitos potencia el estrés oxidativo en las neuronas, por lo que parece ser un factor determinante en los procesos neurodegenerativos.

La demostración de la activación de la iNOS astrocítica en numerosos procesos neurodegenerativos, hace de esta enzima un blanco terapéutico en el tratamiento de los mismos, un ejemplo de lo cual es el empleo del IFN- β en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Financiado parcialmente por el donativo IN-210998 de PAPIIT-DGAPA

REFERENCIAS

1. Bredt D S (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 31: 577-96.
2. Murphy S, Minor R L Jr, Welk G y Harrison D G (1991) Evidence for an astrocyte-derived vasorelaxing factor with properties similar to nitric oxide. *J Neurochem* 55: 349-51.
3. Simmons M L y Murphy S (1993) Roles for protein kinases in the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Glia* 11: 227-34.
4. Giaume C y McCarthy K D (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci.* 19: 319-25.
5. Hewett S J, Csernansky C A y Choi D W (1994) Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 13: 487-94.
6. Chao C C, Hu S, Sheng W S, Bu D, Bukrinsky M I y Peterson P K (1996) Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia* 16: 276-84.
7. Stewart V C, Sharpe M A, Clark J B, Heales S J (2000) Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain. *J Neurochem.* 75: 694-700.
8. Leist M, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton S A y Nicotera P (1995) Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem* 67: 2484-93.

9. Nicotera P, Leist M, Manzo L (1999) Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci.* 20: 46-51
10. Yankner B A (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16: 921-32.
11. Akama K T y Van Eldik L J (2000) Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha)-dependent, and involves a TNFalpha receptor-associated factor- and NFkappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem* 275: 7918-24.
12. Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E e Isobe C (1999) Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 269: 52-4.
13. Liberatore G T, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir A S, Vila M, McAuliffe W G, Dawson V L, Dawson T M y Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5: 1403-9.
14. Almer G, Vukosavic S, Romero N y Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 72: 2415-25.
15. Porter J T, McCarthy K D (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol.* 51: 439-55.

METABOLISMO DEL GLUTATIÓN EN MICROORGANISMOS Y PLANTAS

David Mendoza Cózatl, César Avilés Rodríguez, Andrea Hernández Navarro¹, Herminia Loza Tavera¹ y Rafael Moreno Sánchez. Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología. Juan Badiano 1, Tlalpan Sección XVI C. P. 14080, México D.F. ¹Facultad de Química, UNAM Cd. Universitaria, 04510, México D.F. Correo electrónico: cozatl@hotmail.com

Recibido: 13 de febrero de 2001. Aceptado: 19 de junio de 2001.

RESUMEN

El glutatión es el péptido de bajo peso molecular más abundante dentro de las células y se encuentra prácticamente en todos los organismos. La concentración de glutatión depende de diversos factores ambientales y su interconversión entre la forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG) brinda un adecuado control del estado redox intracelular. Su biosíntesis es a través de la vía de asimilación del azufre, que a su vez está estrechamente relacionada con la síntesis de cisteína. El GSH funciona como el principal almacén intracelular de azufre y cisteína; participa además en el transporte de aminoácidos, metabolitos y en el procesamiento e inactivación de especies reactivas de oxígeno. En plantas y algas es esencial para la tolerancia a metales pesados. Poco se conoce sobre la regulación de su biosíntesis; sin embargo, la reciente clonación de los genes de las enzimas, que participan en la vía ha permitido un estudio más detallado de su metabolismo. El determinar los mecanismos de regulación de la vía puede facilitar su manejo, lo cual podría tener diversas implicaciones en biotecnología.

PALABRAS CLAVE: Asimilación de azufre, cisteína, glutatión, fitoquelatinas, compartimentalización, metales pesados.

ABSTRACT

Glutathione is the most abundant low molecular weight thiol peptide inside the cells and occurs in all organisms. Glutathione concentration depends on diverse environmental factors, and its interconversion among the reduced (GSH) and oxidized form (GSSG) offers an appropriate control of the intracellular redox state. GSH biosynthesis involves the sulfur assimilation pathway, which is closely related with cysteine biosynthesis; in fact, GSH works as the main intracellular sulfur and cysteine storage. It also participates in the

transport of amino acids, metabolites, and in the processing and inactivation of reactive oxygen species. In plants and algae, it is essential for heavy metals tolerance. Little is known about the regulation of GSH biosynthesis. However the recent cloning of the genes encoding the enzymes that participate in the pathway has allowed a more detailed study of its metabolism. The elucidation of the regulatory mechanisms of the pathway will allow its manipulation, which may have biotechnological application.

KEY WORDS: Sulfur assimilation, cysteine, glutathione, phytochelatin, compartmentation, heavy metals.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos con azufre, como la cisteína, metionina, S-adenosilmetionina y glutatión son esenciales para el metabolismo de todas las células. La metionina, salvo pocas excepciones, es el aminoácido con el cual se inicia la biosíntesis de proteínas. La cisteína tiene una función crucial en la estructura, estabilidad y función catalítica de enzimas. La S-adenosilmetionina interviene en la transferencia de grupos metilo y biosíntesis de poliaminas. El glutatión (γ -Glu-Cys-Gly; GSH) tiene diversas funciones dentro del metabolismo. Su capacidad de mantener el estado redox intracelular, además de su participación en el transporte de aminoácidos y detoxificación de xenobióticos, hacen de ésta una molécula esencial. El GSH mantiene enzimas y otros componentes celulares en estado reducido y es, además, el principal almacén y transportador de sulfuro y cisteína [1]. Dentro de la célula, más del 90% del azufre no-proteico está en forma de GSH y la mayoría se encuentra en forma reducida [2]. El GSH es el producto final de una serie de reacciones que constituyen la vía metabólica de asimilación de azufre y síntesis de cisteína.

ASIMILACIÓN DE AZUFRE

El sulfato inorgánico es la principal fuente de azufre para la mayoría de las células; su captación a través de permeasas específicas es dependiente de energía (cotransporte con H^+ ; $3H^+/SO_4^{2-}$; Fig. 1, reacción 1) y no parece regularse por adenosina 5' fosfosulfato (APS), que es el producto de la siguiente reacción en la vía de asimilación. En *Arabidopsis thaliana* y *Lemna gibba* se han caracterizado transportadores de SO_4^{2-} de alta y baja afinidad (Tabla I) [3,4]. En *Neurospora crassa* se han identificado 2 genes, *cys-13* y *cys-14*, que codifican para distintas permeasas las cuales se distinguen tanto en su secuencia como en las Km por el sulfato. El gen *cys-14* fue utilizado para aislar tres cDNA de la planta *Stylosanthes hamata*, que posteriormente fueron identificados como transportadores de sulfato. Dos de estos, *shst1* y *shst2*, se expresan preferentemente en raíces. El tercer gene,

shst3, codifica para un transportador de baja afinidad localizado principalmente en las hojas [1].

Si bien el sulfato es la principal fuente de azufre, no es la única. *N. crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* y otros organismos pueden utilizar compuestos como el sulfato-O-colina, sulfato-O-tirosina y otros sulfatos esterificados como fuente secundaria de azufre, siendo necesaria la síntesis *de novo* de enzimas y permeasas que permitan la captación de estos compuestos. Una vez dentro de la célula, enzimas específicas liberan al azufre en forma de sulfato inorgánico incorporándose a la vía principal de asimilación [1].

ACTIVACIÓN DEL SULFATO

El segundo paso en la asimilación del sulfato inorgánico es catalizado por la ATP sulfurilasa (ATP: sulfato

TABLA I

PARÁMETROS CINÉTICOS DE ALGUNAS DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA ASIMILACIÓN DE SULFATO Y SÍNTESIS DE GLUTATIÓN

ENZIMA	$K_{m\text{ app}}$	V_m	pH ÓPTIMO	ORGANISMO	REFERENCIA
Transportador de SO_4^{2-} baja afinidad	180 μM	2.2 $\mu\text{molg}^{-1}\text{PFh}^{-1}$	5.7	<i>Lemna gibba</i>	3
Transportador de SO_4^{2-} alta afinidad	8.5 μM	0.8 $\mu\text{molg}^{-1}\text{PFh}^{-1}$	5.7	<i>Lemna gibba</i>	3
ATP sulfurilasa	0.87 $\mu\text{M SO}_4^{2-}$	3.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$	8.0	<i>Brassica capitata</i>	5
APS cinasa	3.6 $\mu\text{M APS}$ 1.8 mM ATP	1.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$	8.0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	17
APS-sulfotransferasa (APS reductasa)	6.5 $\mu\text{M APS}$	40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$		<i>Lemna minor</i>	18
O-acetilserina(tiol)liasa (cisteína sintetasa)	1.3 mM OAS 0.25 mM S^{2-}		7.5-8.5	<i>Spinacea oleracea</i>	20
γ -glutamilcisteína sintetasa	1.1 mM Glu 0.8 mM Cys	200 nmol/mg/15min	8.5	<i>E. coli</i>	16
Glutati3n sintetasa	0.63 mM γ -EC 0.4 mM Gly	200 nmol/mg/30min	8.5	<i>E. coli</i>	16
Glutati3n reductasa	90 $\mu\text{M GSSG}$ 6.1 $\mu\text{M NADPH}$	102 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$	7.5	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	19
Fitoquelatina sintetasa	6.7 mM GSH	463 pkat/mg prot	7.9	<i>Silene cucubalus</i>	15

PF, Peso Fresco. 1 kat = cantidad de enzima que cataliza la conversi3n de sustrato a una velocidad de 1 mol por segundo.

adenililtransferasa, EC 2.7.7.4), la cual da como producto APS (Fig. 1, reacción 2) y pirofosfato. La reacción tiene una K_{eq} cercana a 10^{-8} . El grupo de Segel (1982) ha caracterizado parcialmente a la enzima de *Brassica capitata* (Tabla I), la cual presenta una fuerte inhibición por producto ($Ki_{(APS)} = 1 \mu M$) [5].

El 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) es producto de la fosforilación del APS por la adenosina-5'-fosfosulfato cinasa (APS cinasa, Fig. 1, reacción 3). En hongos, el PAPS es utilizado como intermediario en la fosforilación de diferentes compuestos celulares y además, funciona como inhibidor de la ATP sulfurilasa. La PAPS-colina sulfotransferasa, puede transferir el sulfato a la colina, formando sulfato-O-colina, el cual sirve como osmoprotector y como una fuente interna de azufre [1].

En plantas superiores y algas, se han propuesto dos vías diferentes, pero no excluyentes, para la re-

ducción de sulfato hasta sulfuro. En una de ellas, el sulfato del APS es transferido por la APS sulfotransferasa a un intermediario desconocido, formando un complejo sulfito-acarreador (Fig. 1, reacción 12). El sulfito es reducido a sulfuro por la tiosulfonato reductasa, el cual permanece unido al acarreador (reacción 13, Fig. 1) y posteriormente es incorporado a la cisteína por la O-acetilserina(tiol)liasa, usando como sustrato la O-acetilserina (Fig. 1, reacción 6). La existencia de esta vía se demostró en *Chlorella*, cuando la APS sulfotransferasa fue capaz de transferir el grupo sulfato del APS a un intermediario artificial como el ditioneitol (DTT); no se ha establecido la identidad del aceptor *in vivo*, sin embargo el PAPS no fue capaz de actuar como sustrato hasta que una 3'-fosfonucleotidasa estuvo presente [6].

En el protista *Euglena gracilis*, la APS sulfotransferasa activa es un tetrámero, aunque en ausencia de

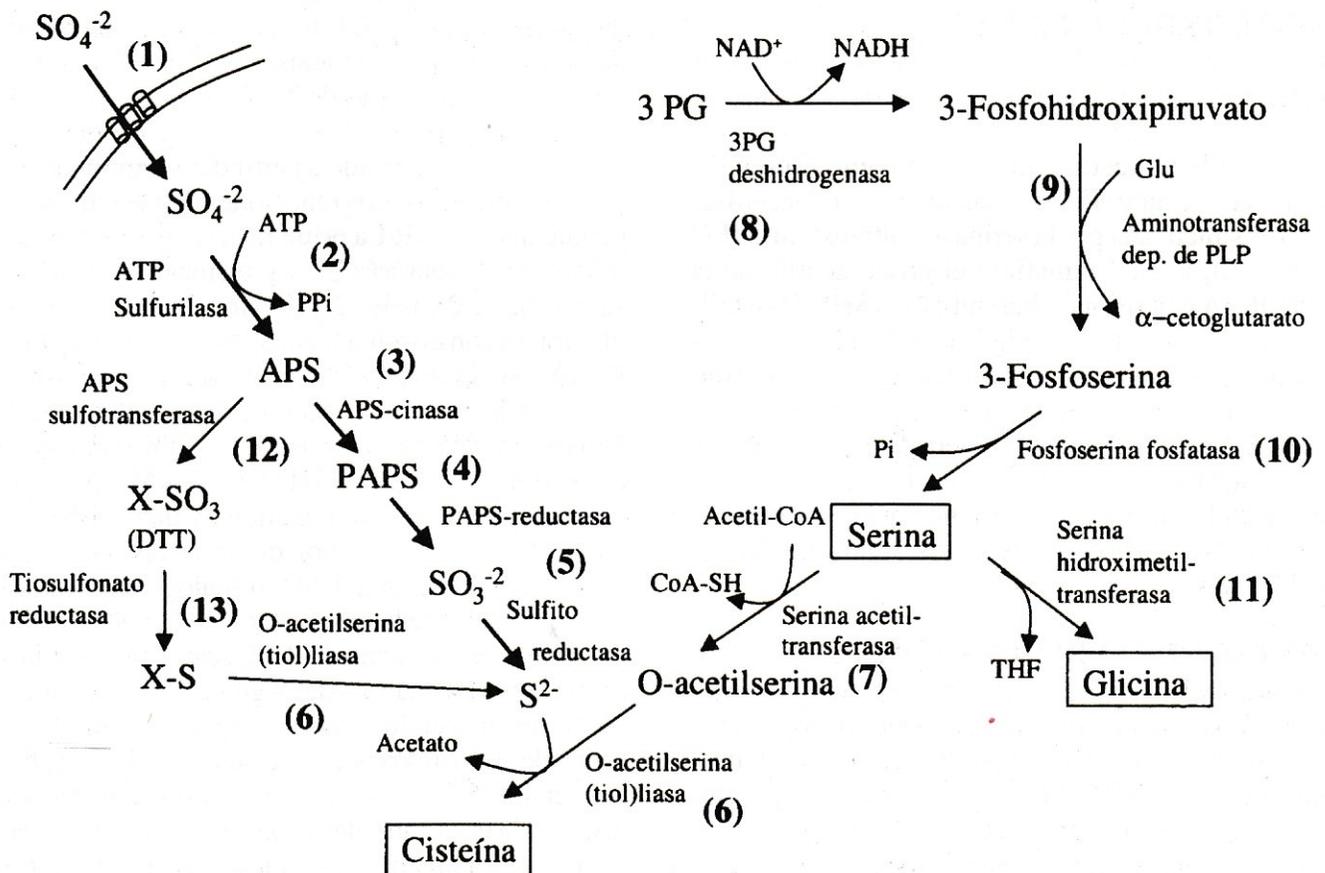


Figura 1. Asimilación de sulfato y biosíntesis de cisteína y glicina. APS, adenosina 5'fosfosulfato; PAPS, 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato; DTT, ditioneitol; THF, N⁵N¹⁰-metilen tetrahidrofolato; PLP, fosfato de piridoxal. El esquema se construyó a partir de la información contenida en las referencias 1,2,4,6,11,18 y 20. Los números entre paréntesis indican el orden progresivo de las reacciones.

APS la enzima se inactiva disociándose en monómeros. Al parecer un residuo de cisteína de esta enzima sirve como acarreador formando un complejo E-S-SO₃⁻² [6], que posteriormente es reducido a sulfuro por una tiosulfonato reductasa dependiente de ferredoxina; a continuación el sulfuro es condensado con la O-acetilserina para la síntesis de cisteína.

En la vía alterna llamada libre de intermediarios, el APS es fosforilado a PAPS por la APS cinasa (Fig. 1, reacción 3). La PAPS reductasa libera el sulfito del PAPS el cual es reducido a sulfuro por la sulfito reductasa (EC 1.8.7.1), y es condensado con la O-acetilserina (Fig. 1, reacciones 3-6). Esta vía está bien caracterizada para enterobacterias y levaduras, pero su presencia en plantas está sujeta a discusión. Se ha detectado la actividad de APS cinasa y sulfito reductasa en varias especies vegetales, sin embargo no hay reportes sobre una actividad similar a PAPS reductasa [6].

SÍNTESIS DE CISTEÍNA

La principal reacción para la síntesis de cisteína es catalizada por la O-acetilserina(tiol)liasa (cisteína sintetasa EC 4.2.99.8), enzima que condensa el sulfuro con la O-acetilserina dando como productos cisteína y acetato (Fig. 1, reacción 6). La O-acetilserina es sintetizada por la serina acetiltransferasa (EC 2.3.1.30), la cual transfiere el grupo acetilo de la acetilCoA a la serina, liberando CoASH y O-acetilserina como productos (Fig. 1, reacción 7). La cisteína también puede sintetizarse a partir de la sulfurilación de la O-acetilhomoserina dando como producto homocisteína, la cual es convertida a cistationina y posteriormente en cisteína [1]. La concentración intracelular de cisteína en plantas y *Euglena* oscila entre 0.2-2 mM (datos de nuestro laboratorio, no publicados).

SÍNTESIS DE SERINA Y GLICINA

La serina y la glicina pueden ser sintetizadas por diferentes vías, aunque ambos aminoácidos provienen del 3-fosfoglicerato (3PG). La 3-fosfoglicerato deshidrogenasa convierte el 3PG en 3-fosfohidroxipiruvato, con reducción del NAD⁺ (Fig. 1, reacción 8). Una aminotransferasa dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) transfiere el grupo amino del glutamato al 3-fosfohidroxipiruvato formando 3-fosfoserina y α -cetoglutarato (Fig. 1, reacción 9). La fosfoserina fosfatasa libera el fosfato de la 3-fosfoserina dando

como producto serina (Fig. 1, reacción 10) la cual puede ser sustrato de dos enzimas. La serina acetiltransferasa, forma la O-acetilserina necesaria para la síntesis de cisteína, transfiriendo el grupo acetilo de la acetilCoA a la serina (Fig. 1, reacción 7), o bien, la serina hidroximetiltransferasa utiliza el grupo metilo de la serina incorporándolo al N⁵,N¹⁰-metilén tetrahidrofolato (THF) liberando glicina como producto, la cual es utilizada en la última reacción de síntesis de GSH (Fig. 1, reacción 11; Fig. 2, reacción 3).

SÍNTESIS DE GLUTATIÓN (GSH)

El glutatión (GSH) se encuentra en todos los organismos y la vía de síntesis es similar. El intervalo de concentración de GSH en plantas, levaduras y *Euglena* oscila entre 0.1-10 mM [2]. Algunas plantas, específicamente *Fabales* (v.g. leguminosas), contienen homólogos de GSH cuyo carboxilo terminal Gly puede ser reemplazado por otros aminoácidos como β -Ala (γ -Glu-Cys- β -Ala; homoglutatión), Ser (γ -Glu-Cys-Ser; hidroximetilglutatión) o Glu (γ -Glu-Cys-Glu) y las formas oxidadas de estos compuestos son reducidas por la glutatión reductasa (EC 1.6.4.2.), (Fig. 2, reacción 1) a expensas de NADPH [7].

El GSH es sintetizado a partir de sus aminoácidos constituyentes por dos reacciones consecutivas dependientes de ATP. La primera la cataliza la γ -glutamilmilcisteína sintetasa (γ -ECS, glutamato-cisteína ligasa, EC 6.3.2.2), (Fig. 2, reacción 2) que condensa glutamato con cisteína formando γ -Glu-Cis (γ -EC). Funcionalmente las γ -ECS de todos los organismos catalizan la misma reacción y presentan valores de K_m similares por los sustratos (Tabla I) e inhibición competitiva por GSH (K_i 2.3 mM). Ninguna presenta inhibición por glutatión oxidado (GSSG) y todas presentan inhibición de tipo irreversible por butionina sulfoximina (BSO) o análogos del γ -glutamilmilfosfato [8]. Se ha propuesto que la fosforilación del átomo de nitrógeno del BSO, catalizada por la γ -ECS, forma un análogo del γ -glutamilmilfosfato (intermediario en el ciclo catalítico) el cual se une al sitio activo de la enzima produciendo una inhibición de tipo irreversible [2]. Si bien la enzima está ampliamente distribuida en la naturaleza, existe una gran divergencia entre organismos respecto a su estructura. Las enzimas de rata y humano están compuestas por dos subunidades, una pesada encargada de la actividad catalítica y una ligera responsable de la regulación; la identidad entre ellas es del 87%. La enzima de *E.*

coli contiene sólo una subunidad y muestra sólo 8% de identidad respecto a la subunidad pesada de la de rata y humano [8].

La segunda enzima en la biosíntesis de GSH es la glutatión sintetasa (GS; EC 6.3.2.3), la cual condensa γ -EC y glicina con gasto de ATP, dando como producto GSH (Fig. 2, reacción 3). La enzima de *Schizosaccharomyces pombe* es un tetrámero formado por dos subunidades de 33 kDa y dos de 26 kDa, tiene un pH óptimo de 8.5 y presenta una Km por γ -EC de 0.63 mM y de 0.4 mM por Gly. La GS se inhibe por GSSG y por concentraciones de γ -EC mayores a 2 mM, pero no por su producto GSH [2].

REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE GLUTATIÓN

Diferentes estudios han demostrado que la regulación de esta vía ocurre a diferentes niveles y a la fecha se han propuesto cuatro: (I) disponibilidad de sustrato, (II) capacidad catalítica de la γ -ECS, (III) inhibición por GSH, de tipo competitiva respecto al Glu, de la γ -ECS, (IV) regulación post-transcripcional, incluida

la traducción y el control de la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de GSH (2,7,9,10).

Se ha determinado un aumento en la concentración de GSH cuando las plantas son asperjadas con H_2S o cultivadas con cisteína, mientras que la adición de glutamato sólo induce un incremento discreto [7]. Los valores de cisteína, obtenidos de tejidos vegetales, reflejan una concentración igual o menor a la Km de la enzima, por lo que este aminoácido se ha propuesto como sustrato limitante [2].

En ciertas condiciones de estrés, cuando hay un aumento en la utilización de GSH, la inhibición de la γ -ECS por GSH disminuye, favoreciendo el aumento en el flujo de la vía. Sin embargo, esta desinhibición sólo es de importancia cuando existe un consumo neto de GSH. Por ejemplo, en el procesamiento de especies reactivas de oxígeno (ERO) se consumen dos moléculas de GSH dando como resultado glutatión oxidado (GSSG). Aparentemente, el consumo de GSH favorecería el flujo de la vía desinhibiendo la γ -ECS, sin embargo el GSSG inhibe a su vez a la glutatión sintetasa. Por lo tanto, la interconversión

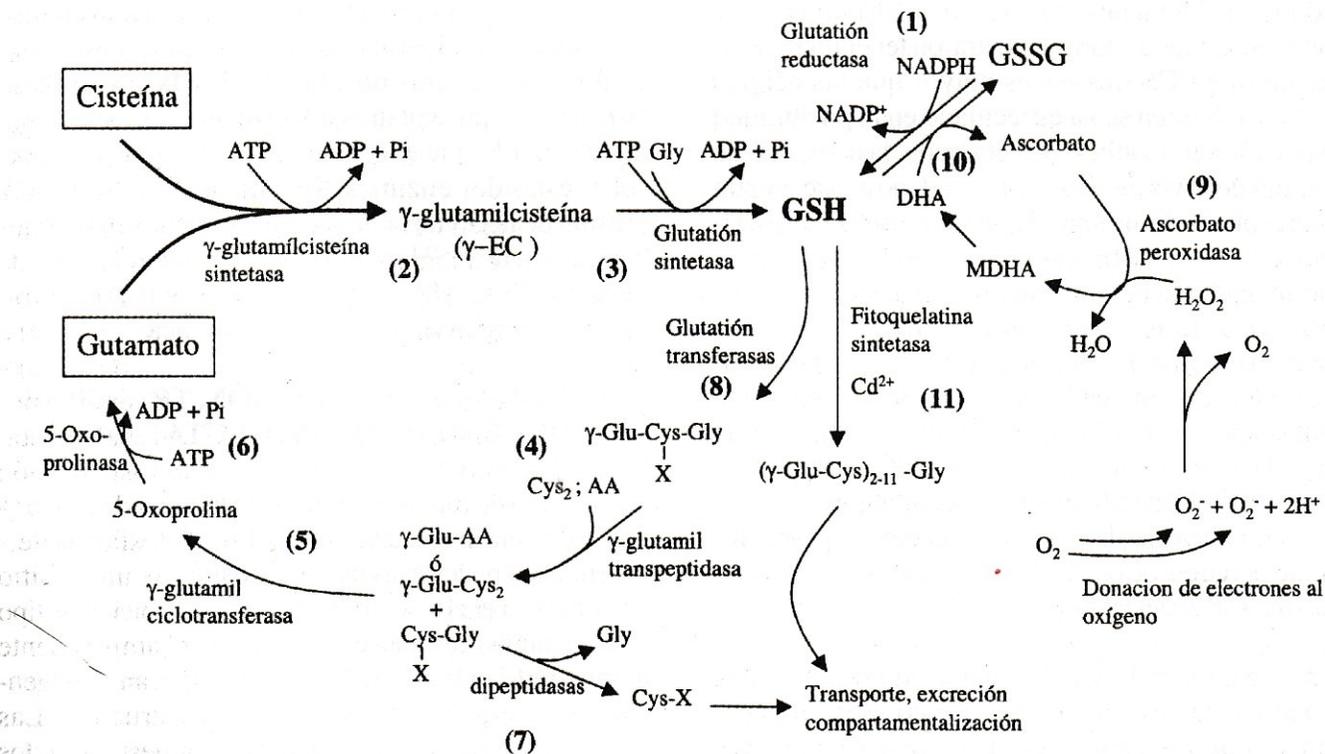


Figura 2. Biosíntesis, degradación de glutatión y síntesis de fitoquelatinas. AA, aminoácido; X, compuesto quelado por glutatión; DHA, dehidroascorbato; MDHA, monohidroascorbato. El esquema se construyó a partir de la información de las referencias 2,7,10,15,16. Los números entre paréntesis indican el orden progresivo de las reacciones.

de GSH a GSSG no resulta en un aumento significativo del flujo, pues no hay consumo neto de GSH sino un cambio en la relación GSH/GSSG, y en este caso la glutatión reductasa (GR) es la responsable de mantener y/o restaurar una elevada relación GSH/GSSG [7].

Una situación donde el aumento en la síntesis de GSH no conduce a su acumulación, y la desinhibición de la γ -ECS favorece el flujo de la vía, es cuando se acopla a la síntesis de fitoquelatinas (polímeros de glutatión capaces de quelar metales pesados). Diversos trabajos han demostrado que a tiempos cortos (minutos-horas), la síntesis de fitoquelatinas (FQ) produce una disminución en la concentración de GSH, lo que incrementa el flujo de la vía [7]. Sin embargo, los niveles de GSH se recuperan e inclusive aumentan respecto a los basales (horas-días), sin detrimento en la velocidad de síntesis de GSH y FQ. Este comportamiento implica que otros mecanismos de control, tales como la activación por efectores y el aumento en la biosíntesis de enzimas operan en esta vía metabólica.

La síntesis de FQ se induce principalmente por cadmio, un metal pesado no esencial. Células de tomate resistentes a cadmio mostraron tener una actividad de la γ -ECS dos veces mayor que las células sensibles. Si bien se ha especulado en la posibilidad de que el cadmio afecte directamente la actividad de enzimas de la vía de síntesis de GSH, no existe ningún reporte que lo demuestre. El aumento en las actividades de la ATP-sulfurilasa, γ -ECS y GS se ha propuesto que se debe a un aumento en la síntesis de las enzimas, es decir control transcripcional [7]. En cultivos de *Arabidopsis thaliana*, la exposición a cadmio indujo un aumento en la expresión de los genes que codifican para la GS (*gsh1*), γ -ECS (*gsh2*) y GR (*gr1*). Hasta una concentración de CdCl₂ 100 μ M, el aumento fue dependiente de concentración; concentraciones mayores disminuyeron el efecto, probablemente debido a otros mecanismos incluida la toxicidad intrínseca del cadmio.

No se conoce la vía de transducción de señales relacionada con el efecto del cadmio sobre la transcripción de los genes de estas enzimas. El estrés oxidativo mediante la exposición a H₂O₂ que conlleva a cambios en la relación GSH/GSSG no se correlaciona con el aumento en la expresión génica [9].

La clonación de los genes de esta vía metabólica ha permitido su sobreexpresión a fin de determinar el efecto de la cantidad de cada enzima en el flujo de la vía. En *Populus spp* (álamo), la sobreexpresión de la GS no indujo cambio alguno en la concentración de GSH, a pesar de que la actividad de la enzima estaba incrementada respecto a las líneas no-transformadas [10]. Sin embargo, un aumento en la concentración de GSH se logró suplementando los cultivos con γ -glutamilcisteína, y en mucho menor proporción suplementando con Cys, lo cual sugería que la enzima limitante era la γ -ECS. Al sobreexpresar la γ -ECS, se obtuvo un incremento de 4 en veces la concentración de GSH; en estas condiciones, la disponibilidad de Cys no fue limitante, sugiriendo que las enzimas relacionadas con la incorporación de azufre tales como la ATP sulfurilasa, APS cinasa y la PAPS reductasa (Fig. 1), tampoco eran limitantes. Por otro lado, la Gly necesaria para la última reacción de la vía involucra la interacción de cloroplastos y peroxisomas (fotorrespiración), por lo que en la oscuridad la Gly se convierte en el sustrato limitante [7,10].

La Tabla I muestra las actividades de las enzimas involucradas en la asimilación de sulfato y síntesis de glutatión. Suponiendo que las enzimas conservan sus características cinéticas, a pesar de que provengan de distintos organismos, la γ -ECS y la GS son las enzimas que presentan una V_m menor respecto a las demás, por lo que el control de la vía podría recaer sobre estas dos enzimas. Sin embargo, la sobreexpresión de la GS no conduce a un aumento en la concentración de GSH mientras que la sobreexpresión de la γ -ECS sí [10], lo cual sugiere que la γ -ECS es una etapa limitante en esta vía metabólica.

COMPARTAMENTALIZACIÓN, TRANSPORTE Y DEGRADACIÓN DE GLUTATIÓN

El GSH se encuentra en diversos compartimentos celulares: mitocondrias, peroxisomas, citosol y, en células vegetales, en el cloroplasto. En células animales, las enzimas necesarias para su biosíntesis sólo están presentes en el citosol, mientras que en plantas superiores y algas, también están en el cloroplasto. Se ha demostrado que cloroplastos aislados de espinaca tienen la capacidad de sintetizar cisteína a partir de SO₄²⁻, lo que sugiere que además de poseer las enzimas para la biosíntesis del GSH, poseen también las enzimas involucradas en la asimilación de SO₄²⁻ [11]. En mitocondrias de raíces de *Brassica juncea*, una

planta acumuladora de metales, se ha propuesto la existencia de la γ -ECS con base en la presencia de regiones típicas de péptidos de tránsito en el gen de esta enzima, aunque su actividad no se ha medido [12].

En diferentes tipos de células de mamífero, ya sean de hígado o de riñón, se ha demostrado que existen dos pozos de GSH: el 70-85% del total pertenece al citosol y tiene una capacidad de respuesta hacia estímulos relativamente rápida ($t_{1/2} = 2$ hrs), mientras que el 15-30% restante pertenece a mitocondrias y su capacidad de respuesta es más lenta ($t_{1/2} = 30$ hrs) [2]. En nuestro laboratorio, se han detectado concentraciones de GSH de 8 mM en mitocondrias de *Euglena* (datos no publicados). La incapacidad de detectar síntesis *de novo* de GSH en fracciones mitocondriales de alta pureza sugirió que el GSH mitocondrial era de origen citosólico. El GSH mitocondrial no puede llegar a la mitocondria por simple difusión, pues el GSH (pI 6.09) tiene carga neta negativa a pH fisiológico y la matriz mitocondrial tiene carga negativa respecto al citosol, además de que hay un gradiente electroquímico, interior negativo, a través de la membrana interna mitocondrial [2].

Se han identificado dos sistemas de transporte de GSH, uno de alta afinidad y poca capacidad y otro de baja afinidad pero de alta capacidad. Ambos sistemas dependen de la presencia de un gradiente de protones y catalizan un proceso electroneutro mediante el intercambio con ácidos dicarboxílicos, como malato y succinato [13]. Si en plantas superiores, el GSH puede ser sintetizado tanto en citosol como en cloroplasto, entonces debe de existir un adecuado abastecimiento de sus precursores hacia ambos compartimentos. En hojas de espinaca las concentraciones de glutamato, tanto en el citosol como en el cloroplasto, son similares [7]. Poco se conoce de la distribución de cisteína, sin embargo este aminoácido puede sintetizarse en ambos compartimentos. La glicina también se encuentra en ambos compartimentos aunque se cree que la concentración citosólica es mayor. Las estimaciones sobre la concentración de GSH en el cloroplasto es de 1-4.5 mM. No se ha reportado para ningún vegetal el transporte o intercambio de GSH entre compartimentos celulares (7).

La vía de degradación del glutatión está confinada al citosol y se ha estudiado tanto en células animales

como vegetales. La gran estabilidad del GSH dentro de la célula la confiere, en parte, el enlace γ -peptídico el cual no es susceptible a la acción de peptidasas ni de la γ -glutamilciclotransferasa; esto implica la existencia de otras reacciones para que los componentes del GSH puedan ser reciclados. La γ -glutamil transpeptidasa es la que actúa sobre el GSH, GSSG y GS-complejos. La transpeptidación (Fig. 2, reacción 4) se lleva a cabo en presencia de otros aminoácidos, formando γ -glutamil aminoácidos. La cistina es el aminoácido preferentemente formado, siendo la forma como se transporta la mayor parte de cisteína a través de la célula, e inclusive a través de tejidos animales. Sin embargo, la metionina y la glutamina también actúan como sustratos de la γ -glutamil transpeptidasa. Los γ -glutamil aminoácidos son sustratos de la γ -glutamilciclotransferasa (EC 2.3.2.4), (Fig. 2, reacción 5), la cual convierte el γ -glutamil aminoácido en 5-oxoprolina y el correspondiente aminoácido libre; la 5-oxoprolina se convierte en glutamato por una reacción dependiente de ATP catalizada por la 5-oxoprolinasa (Fig. 2, reacción 6). Si el GS-complejo es sustrato de la γ -glutamil ciclotransferasa, ésta puede generar el producto complejo-Cys-Gly, el cual es sustrato de dipeptidasas liberando glicina y Cys-complejo (Fig. 2, reacción 7), el cual puede ser transportado intracelularmente o bien puede ser expulsado de la célula [2].

GLUTATIÓN-S-TRANSFERASAS

Las glutatión-S-transferasas (GSTs; EC 2.5.1.18) catalizan la conjugación del GSH con una amplia variedad de compuestos hidrofóbicos, electrofílicos y generalmente tóxicos. Estas enzimas se encuentran en todos los organismos, su función es la detoxificación de compuestos y está acompañada principalmente por tres tipos de reacciones: (I) transformación, donde enzimas como las citocromo P450 monooxigenasas introducen grupos funcionales en los sustratos, formando dobles enlaces u otras características reconocibles; (II) conjugación, donde enzimas como las UDP-glucosil transferasas y las GSTs utilizan el grupo funcional introducido como sustrato uniéndolo al grupo sulfhidrilo del GSH (Fig. 2, reacción 8), resultando en un compuesto menos tóxico y más soluble (GS-complejo), (III) compartimentalización, en la cual ATPasas específicas reconocen los GS-complejos transportándolos a través de membranas para su eliminación o transformación. Las células animales excretan dichos compuestos, mientras que las plan-

tas, que carecen de sistema de excreción, los compartimentalizan en la vacuola [14].

Además de sus propiedades catalíticas, las GSTs actúan no enzimáticamente como proteínas acarreadoras (ligandinas); en animales, en el transporte intracelular de esteroides, bilirrubina, grupos hemo y sales biliares y, en plantas, en el almacenamiento temporal de auxinas, como los ácidos indol acético y naftalén acético [14].

ESTRÉS OXIDATIVO

Durante el consumo de oxígeno, los organismos aeróbicos producen especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Un efecto particularmente tóxico en la producción de ERO es la peroxidación de lípidos, donde los ácidos grasos son convertidos en fragmentos hidrocarbonados como los 4-hidroxi-alquenos, que inhiben a la adenilato ciclasa, y la síntesis de proteínas y ADN. Bajo condiciones normales, existen mecanismos que mantienen las ERO bajo control, como la catalasa, peroxidasa, las GSTs y la glutatión peroxidasa. Los 4-hidroxi-alquenos son metabolizados por GSTs, mientras que la glutatión peroxidasa cataliza la reducción/inactivación del H_2O_2 a través de la oxidación de dos moléculas de GSH formando glutatión oxidado (GSSG), el cual es re-reducido por la glutatión reductasa. El ácido ascórbico también controla las ERO mediante el ciclo llamado ascorbato-glutatión. La ascorbato peroxidasa utiliza dos moléculas de ascorbato a fin de reducir el H_2O_2 con la generación de dos moléculas de monohidroxiascorbato (MDHA), (Fig. 2, reacción 9). Este último compuesto tiene un tiempo de vida muy corta y, si no es desprotonado rápidamente, se convierte en una molécula de ascorbato y otra de dehidroxiascorbato (DHA). La DHA reductasa reduce al ascorbato usando GSH como sustrato oxidable (Fig. 2, reacción 10), generando GSSG el cual es re-reducido por la GR [7].

METALES PESADOS

Las plantas superiores, algas y algunas levaduras, sintetizan fitoquelatinas [$(\gamma\text{-Glu-Cys})_{2-11}\text{-Gly}$] en respuesta a la exposición a metales pesados. Estas moléculas son sintetizadas por la fitoquelatina sintetasa (FS), la cual utiliza al GSH como sustrato. La enzima no requiere de ATP y utiliza al metal pesado como activador esencial, siendo el Cd^{2+} el activador más

potente (Fig. 2, reacción 11), seguido de Ag^+ , Bi^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} y Au^+ . Las fitoquelatinas sintetizadas unen al metal libre y terminan removiéndolo de la enzima regulando de esta manera la reacción de síntesis. Se requieren al menos dos tioles para quelar al metal pesado, y una vez formado el complejo fitoquelatina-metal es transportado activamente a la vacuola a través de un transportador tipo ABC (ATP Binding Cassette). Las fitoquelatinas transportadas tienen un peso de 1-7 kDa, sin embargo, una vez dentro de la vacuola incorporan sulfuro formando complejos de alto peso molecular, de 30-40 kDa, los cuales tienen una mayor capacidad de quelar metales además de ser más estables. Como el mecanismo de resistencia involucra la síntesis de fitoquelatinas, su transporte y la formación de los complejos de alto peso molecular, es comprensible que levaduras con incapacidad de realizar cualquiera de estas tres funciones sean sensibles a metales pesados [15].

CONSIDERACIONES FINALES

Esta revisión, además de describir la biosíntesis del GSH y sus precursores, ha tratado de enfatizar su importancia en diversos procesos celulares: almacén de Cys, transporte de aminoácidos, mantenimiento del estado redox celular, estrés oxidativo, procesamiento de ERO, tolerancia a metales pesados, entre otros. En la industria, la agronomía y la medicina el GSH también es un compuesto de suma importancia, tiene el efecto de potenciar sabores, tiene propiedades anticancerígenas y se le ha relacionado con la robustez de las plantas, sin embargo su producción sintética tiene un costo muy elevado. Para solucionar este problema, diversos grupos se han dado a la tarea de generar sistemas biológicos capaces de producir GSH en cantidades elevadas. Desgraciadamente los resultados no han sido alentadores debido probablemente a la carencia de información acerca de los mecanismos de control de la vía del GSH. Las dificultades encontradas al sobreexpresar las diversas enzimas han ayudado a comprender cómo es la regulación; sin embargo, es necesario hacer un completo análisis de control de la biosíntesis del GSH, que permita entender como está estructurado el control del flujo en la vía. Esto conducirá a mejorar la predicción y el manejo de las enzimas que ejercen el control más significativo sobre el flujo metabólico y sobre las concentraciones de los intermediarios de interés, obteniendo así los resultados deseados.

REFERENCIAS

1. Marzluf G A (1997) Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu Rev Microbiol* 51:73-96.
2. Meister A (1995) Glutathione metabolism. *Methods enzymol* 251:3-13.
3. Lass B y Ulrich-Eberius C I (1984) Evidence for proton/sulfate cotransport and its kinetics in *Lemna gibba* G1. *Planta* 161:53-60.
4. Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith F W, Blake-Kalff M, Hawkesford M J y Saito K (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 23:171-82
5. Osslund T, Chandler C y Segel I (1982) ATP sulfurylase from higher plants. *Plant Physiol* 70: 39-45.
6. Lunn J E, Droux M, Martin J y Douce R (1990) Localization of ATP sulfurylase and O-acetylserine(thiol)lyase in spinach leaves. *Plant Physiol* 94:1345-1352.
7. Noctor G y Foyer C (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249-279.
8. May J M y Christopher J L (1994) *Arabidopsis thaliana* γ -glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and *Escherichia coli* homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* 9:10059-10063.
9. Xiang C y Oliver D (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1539-1550.
10. Noctor G, Arisi A C, Jouanin L y Foyer C (1998) Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiol* 118:471-482.
11. Wray J L, Campbell E I, Roberts M A y Gutiérrez-Marcos J F (1998) Redefining reductive sulfate assimilation in higherplants: a role for APS reductase, a new member of the thioredoxin superfamily? *Chem Biol Interact* 109:153-167.
12. Schäfer H J, Haag-Kerwer A y Rausch T (1998) cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator brassica juncea L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Mol Biol* 37:87-97.
13. Lash L H (1995) Intracellular distribution of thiols and disulfides: assay of mitochondrial glutathione transport. *Methods Enzymol* 252:14-26.
14. Marrs K A (1996) The functions and regulation of glutathione-S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* 47:127-158.
15. Grill E, Löffler S, Winnacker E L y Zenk M H (1989) Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6838-6842.
16. Apontowiel P y Berends W (1975) Glutathione biosynthesis in *Escherichia coli* K12 properties of the enzymes and regulation. *Biochim Biophys Acta* 399:1-9.
17. Lee S y Leustek T (1998) APS kinase from *Arabidopsis thaliana* a genomic organization, expression and kinetic analysis of the recombinant enzyme. *Biochem Biophys. Res Commun* 247:171-175.
18. Suter M, von Ballmoos, Kopriva S, den Camp R O, Schaller J, Kuhlemeier, Schumann P, Bruold C (2000) Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *J Biol Chem* 275:930-936.
19. Libreros-Minolta C A, Pardo J P, Mendoza-Hernández G, Rendon J L. (1992) Purification of glutathione reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Biochem. Biophys* 298:247-53.
20. Droux M, Martin J, Sajus P, Douce R (1992) Purification and characterization of O-acetylserine(thiol)lyase from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 295:379-90.

PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA MUERTE APOPTÓTICA NEURONAL EN EL DESARROLLO Y EN ALGUNAS PATOLOGÍAS

Antonio Valencia Pérez y Julio Morán Andrade. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-253, C. P. 04510, México, D.F. Tel.: 5622-5616. Fax: 5622-5607. Correo electrónico: avalenci@ifisiol.unam.mx y jmoran@ifisiol.unam.mx

Recibido: 29 de noviembre de 2001. Aceptado: 19 de junio de 2001.

RESUMEN

La muerte apoptótica se caracteriza por ser un proceso activo y ordenado en el que participa un gran número de moléculas, incluyendo las caspasas, las cuales degradan una amplia variedad de sustratos durante el inicio o la ejecución del proceso. Durante la muerte apoptótica se presenta un estado de tensión oxidativa, que parece influir de manera definitiva en los mecanismos de la apoptosis. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y otras especies reactivas de oxígeno (ERO) se han relacionado con el daño celular que induce la muerte tanto necrótica como apoptótica. Existen evidencias de que episodios oxidativos participan durante la muerte apoptótica en el sistema nervioso, como en el caso de ciertas patologías (enfermedades de Alzheimer y Parkinson, Síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica), así como durante el desarrollo del cerebro cuando se eliminan neuronas y se establecen las interacciones celulares adecuadas. En todos estos casos se ha propuesto que la tensión oxidativa podría servir como una señal y/o un proceso ejecutor de la muerte apoptótica.

PALABRAS CLAVE: Tensión oxidativa, apoptosis, caspasas, desarrollo neuronal.

ABSTRACT

Apoptotic cell death is an active and highly ordered event that involves a large variety of molecules including caspases. These are proteases acting on a number of substrates during the initiation and execution of apoptosis. During apoptotic cell death a critical increase in oxidative stress occurs, which seems

to play a key role in this process. Hydrogen peroxide (H_2O_2) and some reactive oxygen species (ROS) are involved in apoptosis, including superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($\cdot OH$) and peroxinitrite ($ONOO^-$). A large body of evidence shows that ROS are involved in apoptotic neuronal death in a variety of pathological conditions such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Down's Syndrome and lateral amyotrophic sclerosis. Oxidative stress also plays a role in other events in which neuronal death represents a strategy for eliminating undesirable cells as occurs during the development of the nervous system. In all these cases ROS have been suggested to act as a signal and/or the executor of apoptotic cell death.

KEY WORDS: Oxidative stress, apoptosis, caspases, neuronal development.

INTRODUCCIÓN

El interés por conocer y entender los mecanismos que regulan la muerte neuronal se ha incrementado desde que se estableció la distinción entre dos tipos de muerte celular con características particulares, la muerte apoptótica y la muerte necrótica. La muerte apoptótica es un proceso activo y programado que incluye la expresión de múltiples genes que controlan cada uno de los pasos asociados con el proceso de la muerte celular, mientras que la muerte necrótica es un proceso pasivo asociado con un deterioro generalizado de las funciones y de las estructuras celulares.

Durante la maduración y desarrollo del sistema nervioso casi la mitad de las neuronas mueren co-

mo resultado de la competencia por las células blanco y por el aporte limitado de conexiones presinápticas y/o factores tróficos, y se sabe además que este proceso tiene características de muerte apoptótica. La muerte apoptótica en el sistema nervioso parece estar asociada con algunos estados neurológicos agudos como la hipoglucemia, la hipoxia, el infarto cerebral, la epilepsia, etc., así como en estados neurodegenerativos crónicos como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica. Muchos de estos desórdenes están relacionados con alteraciones en el balance energético de las neuronas y, en muchos de los casos como consecuencia de esto, a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). En diversos modelos de muerte neuronal, este último factor parece ser determinante para la génesis y la evolución de muchos de los trastornos mencionados.

Como se sabe, un metabolismo aeróbico siempre está asociado a la producción de ERO, lo que ha llevado a la evolución de una gran variedad de sistemas bioquímicos antioxidantes. Por lo general un incremento en la tensión oxidativa es un estado fisiopatológico que resulta adverso para la célula que lo experimenta. El desbalance del estado redox de una célula lleva a la acumulación o generación excesiva de ERO, ya sea por un incremento en el metabolismo oxidativo o bien por las alteraciones en los sistemas antioxidantes endógenos. Las ERO son especies químicas derivadas del oxígeno que incluyen aquellas moléculas que presentan uno o más electrones desapareados en su último orbital molecular (radicales libres) y otras que sin ser radicales libres son muy reactivas dada su poca estabilidad electrónica. Las ERO pueden oxidar proteínas (atacando residuos azufrados y provocando entrecruzamiento proteico), lípidos, azúcares, al ácido desoxirribonucleico (ADN) y al ácido ribonucleico (ARN), que como consecuencia puede producir daño y muerte celular.

TENSIÓN OXIDATIVA: ORIGEN, BLANCOS Y DEFENSAS

Para el establecimiento de una condición de tensión oxidativa se requiere de un incremento en la cantidad de ERO. Algunas de éstas incluyen al oxígeno en singulete (1O_2), al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al radical hidroxilo ($\cdot OH$), al óxido nítrico ($NO\cdot$) y al peroxinitrito ($ONOO^-$) entre otros. En la célula existe una amplia variedad de fuentes para la generación de ERO, una de éstas se encuentra en la mitocondria, particularmente en los componentes de la cadena respiratoria (Fig. 1). Durante el transporte de electrones en la mitocondria se forma el $O_2^{\cdot-}$ de manera espontánea y se calcula que entre el 1% y el 5% de los electrones transportados a este nivel forman dicho radical (1). El $O_2^{\cdot-}$ también puede formarse por acción de la xantina oxidasa (enzima involucrada en el catabolismo de los nucleótidos) que tiene como sustrato a la hipoxantina y a la xantina. Se sabe que una modificación de la xantina deshidrogenasa por acción de proteasas dependientes de calcio y/o por la oxidación de sus grupos tiol, se transforma en la xantina oxidasa. Otra fuente importante de la formación del $O_2^{\cdot-}$ está dada por la actividad de la NADPH-oxidasa, la cual es responsable de transferir electrones del NADPH al oxígeno molecular para producir el anión superóxido (Fig. 2). Se ha demostrado la presencia de la NADPH-oxidasa en las

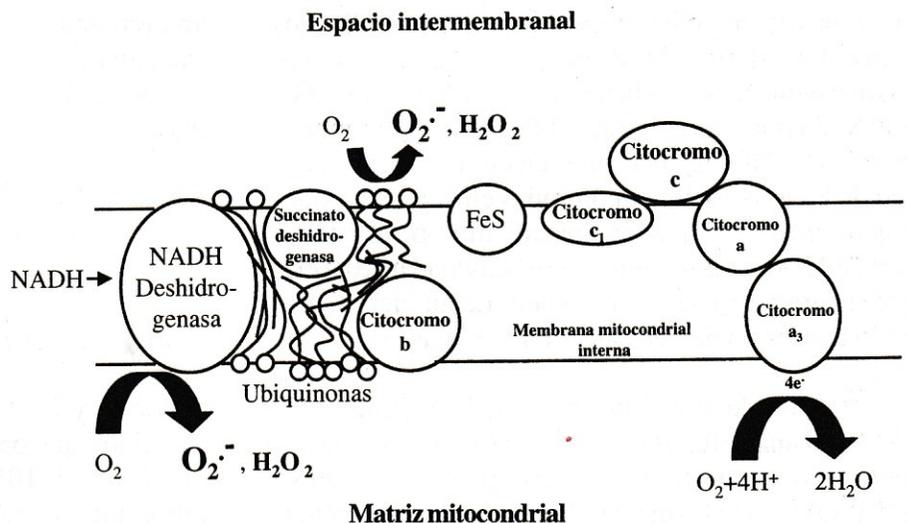


Figura 1. Uno de los sitios donde se generan especies reactivas de oxígeno, específicamente el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, es en los componentes de la cadena respiratoria en la membrana interna de la mitocondria. Particularmente en el ciclo de las ubiquinonas y en la succinato deshidrogenasa se da la formación al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$); a su vez, el anión superóxido formado puede dar origen al peróxido de hidrógeno. Las líneas terminadas en punto indican inhibidores de los componentes de la cadena respiratoria.

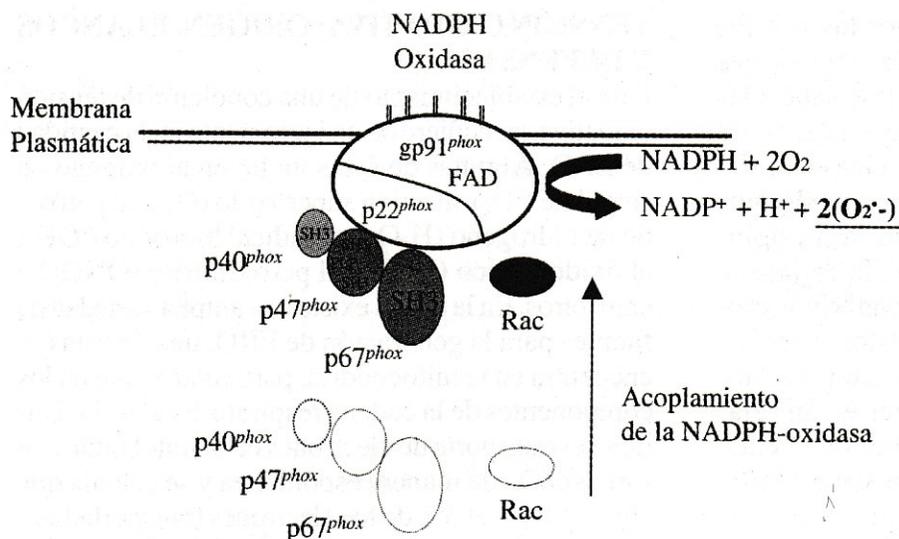


Figura 2. La NADPH-oxidasa es una enzima polipeptídica que tiene la función de generar el anión superóxido a partir del oxígeno y el NADPH. Los componentes de esta enzima son gp91^{phox} (con un sitio de unión a FAD) y p22^{phox}; ambas subunidades se localizan en la membrana plasmática celular. Además, p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox} son componentes citosólicos que se unen a las subunidades membranales para conformar la enzima activa. Algunos componentes de esta enzima (p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}) son proteínas que contienen dominios específicos llamados SH3, los cuales son necesarios para el establecimiento del complejo activo de la enzima. Además, se requiere de una molécula acopladora pequeña que tiene la capacidad de unir GTP llamada Rac. Los dominios SH3, particularmente de la subunidad p47^{phox}, reconocen una secuencia rica en prolinas (PLP) que favorece la unión y el ensamblaje de los complejos enzimáticos. La flecha indica el paso de los componentes citosólicos a un estado de asociación con los elementos de la membrana durante la activación de la enzima.

neuronas de mamífero, y en experimentos realizados con ratones deficientes de esta enzima se ha observado una reducción significativa de la muerte apoptótica inducida por la privación del factor de crecimiento nervioso o NGF en neuronas en cultivo (3-5). A pesar de las evidencias encontradas en algunos modelos *in vitro* e *in vivo*, el mecanismo por el cual la NADPH-oxidasa incrementa su actividad no está claro, sin embargo parece depender de un incremento en la concentración de calcio intracelular (3).

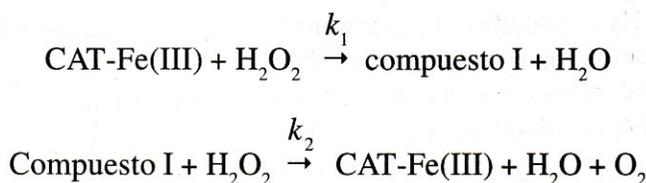
Dentro de la mitocondria se encuentra una de las defensas más efectivas contra el O₂⁻; la enzima superóxido dismutasa que contiene manganeso (MnSOD); esta forma de SOD se localiza en la matriz mitocondrial y está compuesta por cuatro subunidades idénticas. Esta enzima convierte el radical O₂⁻ en H₂O₂ (1). En el citosol existe otra isoforma de la SOD que contiene dos grupos hemo, uno con cobre y otro con zinc (Cu/ZnSOD); esta enzima está compuesta por dos subunidades y cada una contiene un

grupo hemo de Cu/Zn. Una tercera isoforma de la SOD está presente de manera ubicua en los tejidos, la superóxido dismutasa extracelular que también contiene Cu/Zn (ECSOD). La reacción en la cual la SOD dismuta el anión superóxido en peróxido de hidrógeno es la siguiente:



Por otra parte, el H₂O₂ es una molécula con capacidad para difundir a través de las membranas, lo que la hace una molécula con un mayor potencial dañino a cualquier nivel celular, incluyendo membranas, proteínas, ADN, etc. Por tal razón la eliminación del H₂O₂ es tan importante como la del O₂⁻; y la enzima responsable de esta reacción es la catalasa (CAT), enzima dependiente de hierro (Fe III) capaz de transformar el peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua. La CAT es

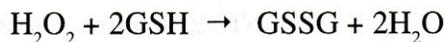
una enzima compuesta por cuatro subunidades y cada una contiene un grupo hemo con Fe III. La reacción mediada por la CAT se puede resumir como sigue:



donde k_1 y k_2 son constantes de velocidad. Se ha calculado que para el caso de CAT del hígado de la rata $k_1 = 1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_2 = 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La estructura exacta del compuesto I es incierta; el hierro es oxidado a una valencia nominal de Fe(V), pero la deslocalización extensiva de carga en sus anillos hace que la descripción en su estructura sea muy difícil de predecir. Es probable que la estructura del compuesto sea un intermediario entre el peróxido férrico (Fe(III)-HOOH) y Fe(V)O. El contenido de CAT en

el cerebro es bajo, al igual que en otros tejidos como el corazón y el músculo esquelético, pero se encuentra en altas concentraciones en el hígado y en los eritrocitos.

Otra enzima antioxidante importante es la glutatión peroxidasa (GSHPx) la cual está presente en el citoplasma y en la matriz mitocondrial. Esta enzima es dependiente de selenio y existen dos isoformas, como dímero y como tetramero. Tiene una alta actividad en el hígado, actividad moderada en el cerebro, el corazón y el pulmón, mientras que tiene una actividad baja en el músculo esquelético. Su sustrato particular es el glutatión, una molécula de bajo peso molecular muy abundante en los seres vivos. Por medio de la siguiente reacción es capaz de ayudar a la eliminación del H_2O_2 de manera indirecta:



donde el GSH es el glutatión reducido y el GSSG es el glutatión oxidado. Además de la GSHPx, existen varias peroxididasas que se encargan de eliminar al peróxido de hidrógeno, entre ellas se encuentran la citocromo c peroxidasa, la NADPH peroxidasa y varias peroxididasas inespecíficas.

Por otro lado, durante la actividad sináptica y otras condiciones tanto fisiológicas como patológicas que involucran un aumento intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$), se induce la formación de $NO\cdot$ a través de la activación de la sintetasa del óxido nítrico (NOS). El $NO\cdot$ generado puede reaccionar con el $O_2\cdot^-$ para formar $ONOO^-$ y éste a su vez puede descomponerse en $\cdot OH$. El radical hidroxilo no se origina por procesos enzimáticos, sino que se forma principalmente a partir de H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} por la reacción de Fenton:



Existen algunas moléculas endógenas capaces de atrapar el electrón de alta energía de los radicales hidroxilo y de esta manera evitar el daño celular. Entre estas moléculas se encuentra el ácido ascórbico, la vitamina E, el ácido úrico, el GSH, algunos alcoholes (polioles), moléculas conteniendo residuos de cisteína, la guanosina y compuestos aromáticos que en sus anillos atrapan dicho electrón inhibiendo la capacidad oxidante del radical.

Otras enzimas con actividad antioxidante en el sistema nervioso son las hemo-oxigenasas. Existen dos tipos, la hemo-oxigenasa-1 (HO-1), que es inducible y la hemo-oxigenasa-2 (HO-2), que es constitutiva. Estas enzimas pertenecen a una familia de proteínas que incorporan el O_2 a un sustrato orgánico para producir grupos hidroxilo, por lo que tienen la habilidad de utilizar el anión superóxido como fuente de electrones. La HO-1 es una enzima microsomal cuya actividad induce la formación de biliverdina y monóxido de carbono. La activación de la HO-1 depende de episodios de tensión oxidativa, y generalmente se presenta en combinación con la actividad de la Cu/ZnSOD en la enfermedad de Alzheimer (AD) (4).

Las ERO pueden actuar a diferentes niveles celulares, incluyendo la peroxidación de los lípidos de las membranas. Se conocen derivados de la lipoperoxidación como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Durante su formación pueden producir entrecruzamiento de las proteínas, atacando residuos de histidina y cisteína particularmente; en general las ERO pueden ocasionar daño celular a diferentes niveles (Fig. 3). Se ha descrito un incremento en la lipoperoxidación luego de episodios prolongados de isquemia, inyecciones de sal de hierro y daño por metil-mercurio. Sin embargo, el daño causado por la tensión oxidativa no necesariamente incluye una peroxidación lipídica (1).

APOPTOSIS

La muerte apoptótica es un proceso activo y ordenado que requiere de la síntesis de ARN mensajero (ARNm) y proteínas. La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios celulares que incluyen la condensación y relocalización de la cromatina, la fragmentación regular del ADN en segmentos homogéneos de alrededor de 158 pares de bases, la pérdida transitoria del potencial de membrana mitocondrial asociado a la liberación del citocromo c, la activación de transglutaminasas específicas, la translocación de fosfatidilserina (PS) de la lámina interna a la externa de la membrana plasmática como resultado de la activación de fosfolipasas específicas y la formación de cuerpos apoptóticos, entre otros (3, 5).

La activación del proceso de muerte incluye la participación de una familia de proteasas de cisteína (caspasas) que está involucrada en el inicio y en la ejecución de la muerte apoptótica (3, 5). Las caspa-

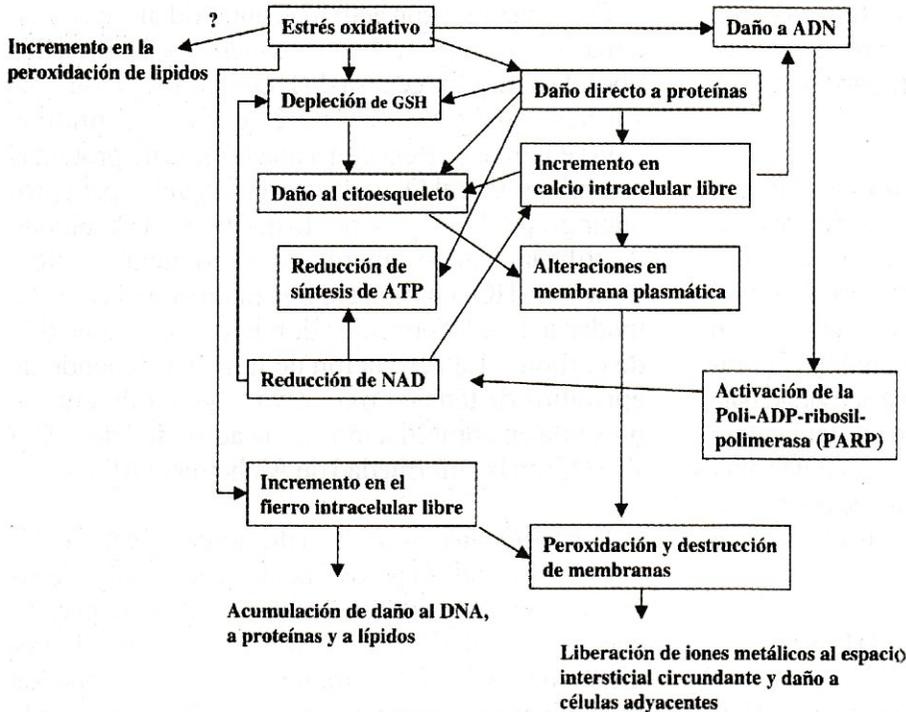


Figura 3. Se ilustran algunos de los mecanismos de interacción durante el daño celular inducido por la tensión oxidativa. El daño puede ser directo, como en el caso de la oxidación de proteínas en grupos -SH inducida por el H_2O_2 , o induciendo la fragmentación del ADN por el $\cdot OH$ y el O_2^- . También hay daño indirecto, como es el provocado por el incremento en la concentración de calcio intracelular, que a su vez puede potenciar la tensión oxidativa. El incremento en el calcio intracelular no sólo activa alguna proteasas dependientes de este ión que atacan a componentes del citoesqueleto, sino que también pueden activarse nucleasas que inducen daño al material nuclear. Además, la sobrecarga de calcio en el mitocondria facilita la liberación de Fe^{3+} , y de esta forma, incrementa el daño oxidante dentro de la célula. (Tomado y modificado de Halliwell, ref. 1).

sas contienen un sitio activo muy conservado con una secuencia QACXG (en donde X puedes ser R, Q o G) y se caracterizan por tener una alta afinidad por los residuos de ácido aspártico en la posición P_1 luego de la secuencia de reconocimiento. Al igual que todas las proteasas, éstas se sintetizan como zimógenos inactivos que requieren ser fragmentadas una o más veces para conformar las caspasas activas. Las caspasas tienen una gran variedad de sustratos como proteínas del citoesqueleto, proteínas citosólicas, proteínas nucleares e incluso otras caspasas. Se conocen 14 caspasas que se han clasificado en dos grandes grupos, como iniciadoras y ejecutoras de acuerdo a su participación en la cascada proteolítica característica. La caspasa-3 es una caspasa ejecutora, que participa en la fase final del proceso de muerte celular, al igual que la caspasa-7 con la que comparte numerosos sustratos y estructura molecular, con

la diferencia de que la caspasa-7 es mitocondrial y la caspasa-3 citosólica (5). La caspasa-3 puede ser activada por otras caspasas iniciadoras como la caspasa-8 o la 9. Las caspasas-8 y 9 necesitan ser reclutadas por otras moléculas conocidas como proteínas adaptadoras o reclutadoras para ser activadas. La caspasa-9 forma complejos con moléculas reguladoras pertenecientes a la familia del Bcl-2 y con el citocromo c para activarse. La caspasa-8 es reclutada por los llamados receptores de muerte, como el receptor al factor de necrosis tumoral (TNF) entre otros, y se activa al formar un complejo peptídico con algunas proteínas adaptadoras, iniciando de esta manera una cascada de proteasas que culmina con la muerte celular (5). Se ha descrito también la actividad de la caspasa-1 en procesos de muerte celular, particularmente en la apoptosis observada por neuronas del sistema límbico cuando se induce isquemia cerebral. Por otro lado, para la caspasa-2 se ha descrito un papel tanto de caspasa iniciadora como ejecutora durante la muerte celular, que junto con el resto de las caspasas su integración en la clasificación de ejecutoras e iniciadoras queda aún incompleta.

Existen otras proteínas asociadas al proceso de muerte con acción antiapoptótica, como la proteína Bcl-2, que está asociada a la mitocondria y parece inhibir la actividad de la caspasa-9. Se ha propuesto que probablemente la proteína Bcl-2 regule la actividad de la caspasa-9 mediante la interacción con el citocromo c cuando éste se ha liberado de la mitocondria y forma un complejo con dicha caspasa (5).

Otras proteínas endógenas que intervienen directamente en la inhibición de la apoptosis son las llamadas proteínas inhibidoras de la apoptosis o IAP's.

Estas proteínas contienen dominios característicos conocidos como BIR (dominio de alta homología con la IAP's de baculovirus), CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) y un anillo RING-"finger" (dominio que interactúa con el ADN en el carboxilo terminal de la proteína). Las IAP's regulan la actividad de las caspasas inhibiéndolas mediante un mecanismo desconocido hasta ahora, pero se sugiere que las caspasas se unen al dominio CRAD de las IAP's inhibiendo su hidrólisis y por tanto su activación. Se ha demostrado que la muerte apoptótica inducida por distintos estímulos se previene en algunos modelos neuronales de células simpáticas *in vitro* mediante la sobre expresión de NAIP (proteína neuronal inhibidora de la apoptosis).

Recientemente se ha demostrado que durante la apoptosis se genera un estado de tensión oxidativa como respuesta a una gran variedad de estímulos inductores de la muerte celular. Como ya se mencionó, se sabe que las células responden a daños oxidativos mediante la activación de las enzimas SOD, CAT y GSHPx. Se ha sugerido también que el Bcl-2 funciona como un antioxidante y que su acción anti-apoptótica se puede deber, en parte, a esta actividad. Sin embargo, no existen evidencias claras que apoyen esta idea (1, 6).

PAPEL DE LAS ERO, EL CALCIO Y LA MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS

La mitocondria es una fuente importante de ERO, particularmente de H_2O_2 y O_2^- . La formación de dichas especies se lleva a cabo durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria. Durante las primeras fases de la muerte apoptótica, los radicales superóxido pueden ser transformados por la MnSOD dentro de la mitocondria en H_2O_2 , el cual difunde hacia el espacio citosólico en donde es capaz de inducir la formación de radicales $\cdot OH$ y producir daño celular (7). Además, cuando hay alteraciones en la producción de la energía celular, particularmente cuando algunos de los complejos de la cadena respiratoria están alterados o desacoplados (complejos mitocondriales I, III y IV), se observan cambios en el equilibrio celular del glutatión, que puede inducir un estado oxidativo importante (7, 8). Se ha demostrado también que la síntesis de ATP se mantiene a lo largo del proceso apoptótico, ya que se han detectado niveles basales de dicha molécula en mitocondrias aisladas de células que han iniciado el proceso de muerte

apoptótica, y esto se ha relacionado con la producción de ERO en fases críticas de dicho proceso. Esto refuerza la idea de que la manutención de un estado energético de la célula cercano a la normalidad es crucial para mantener el proceso de muerte apoptótica (7, 8).

Otro evento importante durante un episodio de tensión oxidativa es la alteración en la homeostasis de calcio intracelular, particularmente por modificaciones en las condiciones iónicas en los organelos que secuestran este catión. La tensión oxidativa afecta la homeostasis de calcio a diferentes niveles. Por un lado, las ERO pueden alterar canales y receptores relacionados con el movimiento de Ca^{2+} , como pueden ser los receptores al inositol 1,4,5-trifosfato o IP_3 y receptores a diferentes neurotransmisores. Esto se ha demostrado en células de corazón y riñón, así como en modelos de isquemia cerebral. Se ha descrito que el receptor a IP_3 es susceptible a oxidación y que cuando esto ocurre se modifica el sitio de unión al ligando, impidiendo de esta forma una vía importante de señalización celular y llevando por lo tanto a alteraciones en la regulación de los niveles de calcio intracelular (7). Se ha demostrado que en el sistema límbico ocurre un daño inducido por oxidación a los autorreceptores de diferentes neurotransmisores, particularmente receptores a glutamato, lo que afecta de manera importante la comunicación sináptica en esta región del cerebro (9). Por otro lado, las ERO pueden inducir una liberación masiva de calcio de pozas intracelulares como la mitocondria y los retículos endoplásmico y sarcoplásmico, en parte por un incremento en la peroxidación de lípidos membranales y como consecuencia de un entrecruzamiento proteico que desestabiliza la membrana (8). Finalmente, la ATPasa dependiente de calcio puede sufrir una inactivación por acción directa de los ERO y/o por alteraciones membranales donde se localiza el complejo de síntesis de ATP, lo que puede generar cambios en las concentraciones de calcio en los diferentes compartimentos celulares (7, 8).

Se ha observado también que un desequilibrio en el calcio intracelular puede generar ERO produciendo un estado oxidante importante en la célula como resultado de una despolarización de la membrana mitocondrial. Esta condición podría inducir la formación de las llamadas megamitocondrias, que son mitocondrias que sufren alteraciones en los flujos

iónicos, en particular de calcio, que han perdido la capacidad de regular el flujo de iones y agua, lo que resulta en su hinchamiento, en un desacoplamiento de los componentes proteicos de la membrana interna, así como en desajustes energéticos. Cabe mencionar que estas megamitocondrias son relativamente comunes durante eventos de muerte celular por apoptosis (7).

En varios modelos celulares de muerte apoptótica ocurre una pérdida temporal del potencial de membrana mitocondrial. Esto se ha asociado a la formación de estructuras llamadas poros de transición mitocondrial (MPT) formado entre la membrana interna y externa de la mitocondria. Está constituido por un poro aniónico dependiente de voltaje y el transportador de nucleótidos de adenina situada en la membrana interna, y por la ciclofilina D, la cual induce su activación. La actividad del MPT está modulada por otras proteínas, como receptores a benzodiazepinas, hexocinasas, cinasas de glicerol, cinasas de creatina y por la proteína Bax. Se ha propuesto que la formación del MPT está relacionada con la liberación del citocromo c y una subsiguiente activación de caspasa-9, sin embargo esto no ha podido ser demostrado. Se ha sugerido que para que el MPT se mantenga como complejo funcional se requiere de un estado oxidativo alto en la mitocondria, es decir, la formación temporal de ERO por arriba de un umbral que promueve la formación, el mantenimiento y la apertura del poro. Algunos estudios proponen que el MPT puede ser una vía de salida de especies reactivas de oxígeno, particularmente del O_2^{\cdot} formado en la mitocondria. La formación del poro depende en gran medida de una alteración en el calcio intracelular que conlleva a un desajuste en la permeabilidad de los flujos de este catión en la membrana mitocondrial interna. Para la formación del MPT se necesitan, además de un incremento de calcio mitocondrial, otras condiciones específicas como una reducción en la translocación de nucleótidos de adenina hacia la mitocondria, altas concentraciones de fosfato inorgánico (Pi) y peróxidos mitocondriales (8). Sin embargo, hay algunos modelos de apoptosis en los que no se forma el poro y sí se incrementa la tensión oxidativa, lo que sugiere diferentes vías de inducción y ejecución de la apoptosis.

Además de las alteraciones iónicas y del aumento en los niveles de ERO, el incremento en las concen-

traciones citoplásmicas de Ca^{2+} puede traer como consecuencia una activación de endonucleasas o proteasas dependientes de calcio, además de modificaciones en la señalización intracelular lo que, dependiendo de la intensidad del estímulo, podría contribuir a que las células se recuperen o mueran apoptóticamente (8, 9). En general los sistemas de daño celular que involucran tensión oxidativa y calcio suponen que parte de los mecanismos que se llevan a cabo son consecuencia de un aumento en las concentraciones de calcio intracelular. Sin embargo, en otros modelos se sabe que una reducción de calcio intracelular puede acarrear un estado de tensión oxidativa, que puede terminar en la muerte celular con características apoptóticas. Esta condición ocurre en algunos modelos de muerte programada durante el desarrollo en la que una privación de estímulo trófico representa una señal para eliminar a la célula (2, 10).

La participación de las ERO en el proceso apoptótico se ha sugerido con base en experimentos donde la adición de la SOD u otros antioxidantes mantiene las células viables por más tiempo y/o reduce las posibilidades de que mueran apoptóticamente. El mecanismo de acción de las ERO en la inducción de la muerte apoptótica no se conoce, pero se ha sugerido que la tensión oxidativa podría ser una señal de inicio en este proceso. Una hipótesis al respecto, es que las ERO podrían activar a las caspasas tanto iniciadores como ejecutoras mediante una acción directa o indirecta por un mecanismo aun no determinado. En modelos *in vitro* las ERO son capaces de inducir alteraciones apoptóticas como condensación nuclear, fragmentación del ADN, alteraciones membranales y la activación de caspasas. Esto se ha demostrado en neuronas de la región CA1 del hipocampo luego de episodios de isquemia cerebral, así como en neuronas privadas de factor trófico durante el desarrollo, donde en ambos casos se incrementan los niveles de ERO (8). Sin embargo, aún no queda claro si estos eventos ocurren directamente por acción de los ERO o como consecuencia de la activación de proteasas inducidas durante la muerte celular. A pesar de las evidencias que relacionan a la tensión oxidativa con la muerte apoptótica, la formación de ERO y que los tratamientos con antioxidantes inhiben la actividad de las caspasas y de la muerte, no se conocen los mecanismos que involucran a las ERO en el proceso general de muerte celular.

APOPTOSIS DURANTE EL DESARROLLO NEURONAL

Está descrito que en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso, las influencias pre y postsinápticas juegan un papel determinante para la diferenciación y el establecimiento de los circuitos neuronales que conformarán el sistema nervioso. Durante las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso de mamíferos casi el 50% de las neuronas muere de manera programada. Se ha sugerido que esta muerte representa una estrategia para seleccionar tanto al número de células como a las mejor conectadas para tener la mejor organización funcional del sistema nervioso maduro.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio con neuronas de cerebelo durante el desarrollo, se ha demostrado que ocurre una muerte con características apoptóticas cuando las células se someten a una deficiencia de factores tróficos o de estimulación sináptica similar a la que ocurre *in vivo*. Durante la primera fase de este proceso de muerte ocurre una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ como un evento primario y crítico. La reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ conduce, a través de un mecanismo aún desconocido, a la generación de un estado oxidativo importante, seguido de la translocación de fosfatidilserina (PS) a la lámina externa de la membrana plasmática, de la activación de caspasas-8 y 3 y una condensación de la cromatina que preceden a la muerte neuronal. Cuando las células son tratadas con SOD, CAT o con otros antioxidantes se bloquean la translocación de PS, la activación de caspasas-8 y 3, y se previene la muerte neuronal. Esto sugiere que las ERO generadas luego de una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ pueden disparar el programa de muerte y la cascada de activación de las caspasas. La protección a neuronas privadas de factores tróficos y neurotransmisores durante el desarrollo no parece ocurrir a través de una restauración de niveles de $[Ca^{2+}]_i$ (10).

Se sabe también que una deficiencia del factor de crecimiento neuronal (NGF) en neuronas simpáticas en cultivo genera un incremento de la tensión oxidativa y precede a una muerte neuronal con características apoptóticas. La protección que dan tratamientos antioxidantes contra esta muerte neuronal por privación de NGF es muy clara, y particularmente aquellos realizados con secuestradores de ERO (1). Utilizando este mismo modelo, se observó una marcada

disminución en la muerte apoptótica de las neuronas privadas de NGF en ratones carentes de la enzima NADPH-oxidasa (2). Todo esto apoya la hipótesis que plantea que un incremento en la tensión oxidativa es un proceso temprano y esencial en la activación de la muerte neuronal por apoptosis asociada a la privación de factores tróficos.

ISQUEMIA, HIPOXIA Y MUERTE NEURONAL

La hipoxia e isquemia son condiciones en las que ocurre una alteración en el suministro de oxígeno y de glucosa en diferentes tejidos de los organismos, que en el caso del sistema nervioso generalmente se asocia a traumas y accidentes cerebro-vasculares. En cerebros isquémicos se presenta una considerable disminución energética, particularmente en fosfatos orgánicos, por lo que los niveles de ATP disminuyen de manera importante. En respuesta a esto, en un intento por mantener los niveles de ATP en condiciones óptimas, se incrementa la glucólisis, presumiblemente a través de la desinhibición de la fosfofructocinasa (encargada de transformar la fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-difosfato durante la glucólisis), lo que trae como consecuencia indirecta un incremento en la producción de ácido láctico. El aumento de ácido láctico induce un incremento en la concentración de protones $[H^+]$ en la célula y se genera una condición de acidosis láctica. El incremento de la $[H^+]$ en las células afecta la estructura de proteínas, las tasas de actividad enzimática, la reactividad de sustratos y los mecanismos de transporte a través de membranas (11). Además, se sabe que esta alteración energética en cerebros isquémicos e hipóxicos aumenta la susceptibilidad a daño neuronal inducido por ácido glutámico, ya que durante estos episodios como resultado del incremento de calcio intracelular se da una mayor liberación de glutamato, lo que produce muerte neuronal que en algunos casos presenta características apoptóticas.

Debido a las alteraciones membranales resultantes de una caída en la producción de energía y de la acidosis láctica, ocurre una entrada masiva de Ca^{2+} por canales sensibles a voltaje y/o por canales acoplados a receptores, como es el caso de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA. Por otro lado, las condiciones de bajo ATP y alto ácido láctico también inducen una salida de calcio de la mitocondria, como resultado de alteraciones membranales y de los cambios en las fuerzas iónicas y de pH que modifican los

sistemas de homeostasis de dicho catión (11). Durante estos episodios se establece también una condición transitoria de tensión oxidativa asociada a una muerte neuronal tanto necrótica como apoptótica. Las alteraciones metabólicas mencionadas inducen procesos que favorecen un incremento en los niveles de ERO. Se sabe que segundos después de establecida la isquemia e hipoxia hay una liberación de ácidos grasos, incluyendo al ácido araquidónico. El incremento de estos ácidos grasos puede tener un impacto a diferentes niveles, principalmente desacoplando la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones mitocondriales e induciendo la producción de ERO. Por otro lado, la formación de ERO también se incrementa como resultado de la actividad de las monooxigenasas y de la autooxidación del ácido araquidónico, así como por un incremento significativo en la actividad de la enzima xantina oxidasa (11).

Se ha demostrado en modelos de isquemia transitoria en ratas que una fracción importante de la muerte neuronal presenta características apoptóticas. Bajo estas condiciones se sabe que tanto la actividad como los niveles de ARNm de diversas caspasas se incrementan significativamente en diferentes regiones cerebrales. Particularmente, en ratas con isquemia se encontró un incremento en el ARNm y la actividad de la caspasa-3 de las neuronas glutamatergicas del área CA1 del hipocampo después de 8 horas. En este mismo modelo se encontró también un incremento en la actividad de la caspasa-1 en otras áreas del hipocampo después de 24 horas de la oclusión arterial. Tratamientos paralelos con inhibidores específicos de la caspasa-3 (DEVD-CHO) y de la caspasa-1 (YVAD-CHO) o con un inhibidor de amplio espectro de las caspasas (ZVAD-CHO) resultó en una disminución significativa de la muerte neuronal (11).

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS, TENSIÓN OXIDATIVA Y APOPTOSIS

–Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una pérdida sustancial y progresiva de la memoria y episodios agudos de demencia, ambos asociadas a una degeneración y pérdida paulatina de neuronas, particularmente en la región límbica. Se ha descrito un incremento importante en la peroxidación de lípidos de membrana y un gran daño al ADN por agentes

oxidantes en etapas avanzadas de esta enfermedad (12). El incremento en la lipoperoxidación y sus derivados (el 4-HNE y MDA) está directamente relacionado con la formación de los nódulos neurofibrilares (NFT) y de las placas seniles (SP), que son características de la enfermedad de Alzheimer. Un aspecto interesante de esta enfermedad es que dos de las enzimas antioxidantes del cerebro, la SOD y la HO-1, responden de manera activa y conjunta a estímulos oxidantes. Durante la formación de los NFT se ha visto que la HO-1, pero no la HO-2, incrementa su actividad de manera paralela a la formación de dichas estructuras (6, 8). Esto sugiere que las alteraciones celulares y tisulares causadas en parte por la oxidación inducen la formación de NFT y SP. Por otro lado, el péptido β -amiloide, relacionado con la enfermedad de Alzheimer, es un candidato para explicar el origen de las ERO en esta patología, ya que bajo ciertas condiciones el péptido puede adquirir un estado de radical libre. En algunos modelos *in vitro* se ha podido detectar la conversión del péptido en un radical libre, el cual induce un incremento importante en los niveles de H_2O_2 y de NO. En un estudio *in vitro* se encontró que la inducción de muerte apoptótica por la privación de estimulación en neuronas cerebelares genera la producción y liberación de péptido β -amiloide (9). Recientemente se ha descrito la participación de caspasas durante la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer, particularmente se ha referido que la caspasa-12 participa como una caspasa iniciadora asociada al retículo endoplásmico (15). También se sabe que la muerte neuronal asociada al incremento en la acumulación del péptido β -amiloide es dependiente de la caspasa-2 (13). Estos estudios sugieren entonces que gran parte de la muerte neuronal que sucede en la enfermedad de Alzheimer es apoptótica, dependiente de caspasas y además que está asociada a un incremento en la tensión oxidativa.

–Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa dependiente de la edad que se caracteriza por una degeneración de neuronas de la corteza motora, del tallo cerebral y de la médula espinal. Su clímax sintomático se presenta en la mitad de la vida del paciente, presentándose paulatinamente una parálisis motora parcial o total y terminando con la muerte del individuo. A escala celular se ha encontrado que en las células afectadas se

observa un hinchamiento de los organelos y un daño mitocondrial severo que incluye vacuolización y pérdida de la permeabilidad mitocondrial asociada a un incremento anormal en la $[Ca^{2+}]_i$ y a la muerte de las neuronas como evento final. Estudios genéticos definieron que el *locus* de la esclerosis lateral amiotrófica se encuentra en el cromosoma 21, donde se encuentra también el gen de la Cu/Zn SOD, que en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica familiar está mutado. Existen evidencias de una relación entre la esclerosis lateral amiotrófica y la alteración de los sistemas antioxidantes, los cuales no son capaces de convertir el superóxido producido normalmente por la célula, generando una condición de tensión oxidativa responsable de una serie de daños celulares importantes (14). Se ha demostrado también una alteración en la señalización de la vía del glutamato en esta patología, induciendo la formación de $NO\cdot$ de manera constitutiva. El $NO\cdot$ formado reacciona con el O_2^- para formar $ONOO^-$, lo que genera alteraciones oxidantes que culminan en el daño celular y en una pérdida importante de neuronas con características de muerte apoptótica y necrótica, siendo esta última la más abundante. Aunque se desconoce con detalle los mecanismos involucrados en esta patología, las evidencias coinciden en señalar a las ERO como una pieza clave en la evolución de dicha enfermedad (11).

–Síndrome de Down

El Síndrome de Down se origina por una trisomía del cromosoma 21 e involucra una pérdida neuronal masiva. Este Síndrome comparte ciertas características citopatológicas con la enfermedad de Alzheimer. Al igual que en la enfermedad de Alzheimer, parte de la muerte celular observada presenta características apoptóticas, como la condensación de la cromatina y la fragmentación homogénea del ADN. Otra parte de la población neuronal que muere muestra signos de muerte necrótica (15). El gen que codifica para la Cu/Zn SOD se encuentra en el cromosoma 21, por lo que la actividad de dicha enzima se encuentra por arriba de los niveles normales en pacientes con Síndrome de Down. Se sabe que el incremento en la actividad de Cu/Zn SOD, debida a la trisomía, induce una alteración del sistema redox de la célula, lo que produce desajustes oxidantes que puede terminar en la muerte neuronal. Estos desajustes son consecuencia de alteraciones del equilibrio de los componentes enzimáticos de la

SOD y de la GSHPx, ya que la formación exacerbada de H_2O_2 a partir del O_2^- por la actividad de la Cu/Zn SOD es muy alta y termina siendo extremadamente tóxico para la célula. Hay evidencias que indican que esta condición oxidativa provoca la pérdida neuronal paulatina en pacientes con Síndrome de Down. En experimentos hechos con neuronas corticales en cultivo obtenidas de cerebros de pacientes con Síndrome de Down, se demostró que hay una población neuronal que muere paulatinamente y otra que no lo hace. El tratamiento de estas neuronas con antioxidantes como N-terbutil-2-sulfofenilnitrona (PBN), vitamina E y otros secuestradores de ERO, resulta en una reducción marcada de la muerte neuronal, demostrando con estos estudios, la participación directa de la tensión oxidativa en la muerte apoptótica de neuronas de pacientes con Síndrome de Down. (15).

–Enfermedad de Parkinson

Esta patología se caracteriza por un deterioro gradual de neuronas que sintetizan dopamina localizadas en la sustancia *nigra* del cerebro. La muerte de una fracción de las neuronas de la sustancia *nigra* presenta características apoptóticas, particularmente una condensación y fragmentación del ADN tanto mitocondrial como nuclear. Como resultado de la deficiente comunicación dopaminérgica resultante, ocurren severas alteraciones tanto motoras como sensoriales. Se ha sugerido que la degeneración del sistema nigroestriatal se origina como resultado de una exposición elevada de estas neuronas a algunas ERO y particularmente al H_2O_2 . La desaminación de la dopamina a 3,4-dihidroxifenilacetaldehído genera H_2O_2 , además de que la dopamina puede autooxidarse espontáneamente formando quinonas, H_2O_2 y $\cdot OH$ (12). Por otro lado, se ha detectado un incremento anómalo de hierro en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* de pacientes con la enfermedad de Parkinson, condición que favorece la reacción de Fenton, la cual produce radicales hidroxilo a partir de H_2O_2 . Se ha descrito además, una depleción de GSH en pacientes con la enfermedad de Parkinson, que se sabe funciona como defensa en contra de las ERO. El incremento de peróxidos asociados a la disminución de GSH provoca una pérdida parcial en el transporte de electrones de la cadena respiratoria de alrededor del 70% con respecto a sus controles, dañando particularmente a los complejos mitocondriales II y IV de dicha cadena (9).

–Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es otra de las enfermedades neurodegenerativas que involucra una pérdida neuronal. Durante esta enfermedad se dan episodios de demencia y sobre todo movimientos involuntarios agudos que están relacionados al daño neuronal (15). Esta enfermedad neurodegenerativa genética es causada por la acumulación de una proteína llamada huntintina. En condiciones basales la huntintina esta presente en las células, aunque su función es desconocida hasta ahora (15). Gran parte de la muerte neuronal en esta enfermedad se presenta en la región neocortical, donde las neuronas gabaérgicas espinales constituyen el 90% de la población. La excitotoxicidad es uno de los eventos más comunes durante la muerte neuronal en la enfermedad de Huntington. Se sabe que durante la enfermedad existen periodos críticos donde las condiciones excitadoras se incrementan, teniendo como consecuencia el incremento en los niveles de calcio intracelular y la progresiva muerte neuronal. Se ha descrito también que durante este periodo de daño se incrementan los niveles de NO asociado a un estado de tensión oxidativa importante debido a la formación de peroxinitrito y peróxido de hidrógeno (15). La muerte de neuronas en la enfermedad de Huntington tiene tanto características necróticas como apoptóticas. En los últimos años se ha descrito la participación de caspasas durante estos eventos. Particularmente se sabe que la caspasa-1 está estrechamente relacionada con la muerte neuronal en la enfermedad de Huntington. En animales deficientes de la caspasa-1 se encontró una disminución en los síntomas de la enfermedad y en la muerte neuronal. Se ha propuesto también que la caspasa-3 es capaz de hidrolizar a la huntintina, sin embargo no se conoce bien cual es el resultado de este procesamiento (15).

A pesar de las evidencias del papel de las ERO en enfermedades neurodegenerativas y sus características asociadas a la muerte apoptótica, no se han descrito suficientes modelos de muerte neuronal que relacionen la activación de caspasas (marcadoras de apoptosis) y el daño oxidante en estas patologías. Sólo algunos trabajos *in vitro* han establecido una correlación entre el estado oxidante y la activación de caspasas, sugiriendo que el incremento en la tensión oxidativa induce la activación de caspasas (particularmente la caspasa-1 y la caspasa-3) en el modelo de la enfermedad de Alzheimer y de isquemia e hipo-

xia, donde además se observa un incremento en el mensajero de la caspasa-3.

CONCLUSIONES

Las especies reactivas de oxígeno pueden constituir una condición nociva para la célula induciendo muerte y provocar un daño al organismo. En la activación y posterior desarrollo de algunas patologías del sistema nervioso las ERO juegan un papel importante. En el caso del Síndrome de Down y la esclerosis lateral amiotrófica el establecimiento de la tensión oxidativa puede ser el resultado de una alteración de los sistemas antioxidantes endógenos. Los tratamientos de estas patologías con estrategias dirigidas al control y regulación de la tensión oxidativa pueden resultar útiles para controlar tanto su génesis como su desarrollo o en algunos casos para eliminar los efectos secundarios resultantes de la tensión oxidativa asociada a la enfermedad. Para entender estos mecanismos, el estudio de la participación de la tensión oxidativa en la muerte celular en casos donde la muerte apoptótica es un evento necesario, también es importante, como ocurre durante el desarrollo donde la eliminación de neuronas es determinante para la formación y buen funcionamiento del sistema nervioso.

Aun cuando no se ha podido determinar la relación entre la formación de ERO y los mecanismos de muerte celular, se sabe que durante la apoptosis la tensión oxidativa juega un papel central. Se ha sugerido que las ERO pueden activar directa o indirectamente a las caspasas. Es importante mencionar que a pesar de que las ERO están involucrados en la muerte apoptótica, no queda claro si esta condición oxidante es un disparador de la apoptosis, una consecuencia del programa de muerte o ambas, dependiendo del estímulo y la condición fisiológica de la célula que lo experimenta. Quedan aún muchas preguntas por resolver, particularmente en relación con los mecanismos que involucran al calcio, a las ERO y a las moléculas pro y antiapoptóticas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos los valiosos comentarios y sugerencias que durante la revisión del manuscrito fueron realizados por la Dra. Lourdes Massieu del Departamento de Neurociencias del IFC, UNAM, por el Dr. Wilhelm Hansberg del Departamento de Bioquímica del IFC, UNAM y por el Dr. Alejandro Zentella del Departamento de Biología Celular del IFC, UNAM.

REFERENCIAS

1. Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623.
2. Tammariello S, Quinn M y Estus S (2000) NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 20:1-5.
3. Wyllie A H y Currie A R (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Inter Rev Cytol* 68:251-306.
4. Smith M A, Kutty R y Richey P (1994) Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 145:42-47.
5. Martin S J y Green D R (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82:349-352
6. Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P y Schubert D (1998) The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141:1423-1432.
7. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychouhury S y Chakraborti S (1999) Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 11:77-85.
8. Castilho R, Ward M y Nichols D (1999) Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 72:1394-1401.
9. Ceballos-Picot I (1997) The role of oxidative stress in neuronal death. *Neuroscience Intelligent Unit*. Springer. New York, NY, USA, p 203.
10. Valencia A y Morán J (2001). Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 64:284-297.
11. Ni B, Wu X, Su Y, Stephenson D, Smalstig E, Clemens J y Paul S (1998) Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:248-256.
12. Yanker B (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16:921-932.
13. Troy C, Rabacchi S, Friedman W, Frappier T, Brown K y Shelanski M (2000) Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by β -amyloid. *J Neurosci* 20:1386-1392.
14. Elliot J (1999) Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology diseases* 6:310-320.
15. Ona V, Li M, Vonsattel J, Andrews L, Khan S, Chung W, Frey A, Menon A, Li X, Stieg P, Yuan J, Penney J, Young A, Cha Y y Friedlander R (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 399:263-267.

ENZIMAS MÁS ALLÁ DE SU ÁMBITO FISIOLÓGICO: LIPASAS

Ismael Bustos Jaimes, Gabriela M. Montero Morán, Samuel Lara González y Laura I. Álvarez Añorve. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apartado Postal 70-159, C. P. 04510, México D.F. Correo electrónico: ismaelb@servidor.unam.mx

Recibido: 30 de marzo de 2001. Aceptado: 19 de junio de 2001.

RESUMEN

Las lipasas son enzimas que fisiológicamente hidrolizan lípidos con fines nutrimentales. Sin embargo, estas enzimas pueden ser utilizadas con fines distintos, muchos de los cuales se llevan a cabo en condiciones extremas como altas temperaturas, pH extremo o en presencia de disolventes orgánicos, provocando la alteración de sus propiedades catalíticas. Sus usos industriales han sido para la producción de triacilglicérols con restos de ácidos grasos de importancia nutricional o funcional en alimentos, ya sea por síntesis a partir de ácidos grasos y glicerol o por reacciones de transesterificación con grasas y aceites comerciales. También se han utilizado para la separación de mezclas racémicas en síntesis orgánica, permitiendo obtener compuestos estereoquímicamente enriquecidos. Recientemente se han utilizado para la síntesis de polímeros como poliésteres e incluso para la degradación de los mismos en condiciones no biológicas. Las lipasas han demostrado ser sumamente versátiles fuera de los sistemas biológicos tradicionales.

PALABRAS CLAVE: Lipasas, aplicaciones industriales, biotransformaciones.

ABSTRACT

Lipases are enzymes that, under physiological conditions, hydrolyze lipids for nutrimental aims. However, these enzymes may be used with different purposes, some of them are carried out in extreme conditions such as high temperature, extreme pH values or in the presence of organic solvents, leading to a change in their catalytic properties. Their industrial applications have been in the production of triacylglycerols, containing fatty acid residues of nutritional or functional importance in food systems, from fatty acids and glycerol or by transesterification reactions with commercial oils and fats. Lipases have also been used for the resolution of racemates in

synthetic-organic chemistry, producing stereochemically-enriched compounds. Recently, these enzymes have been used for polymeric-substances synthesis as polyesters and even for their non-biological degradation. Lipases have shown to be very suitable biocatalysts outside biological systems.

KEY WORDS: Lipases, industrial applications, biotransformations.

INTRODUCCIÓN

En las ciencias bioquímicas acostumbramos a ver a las enzimas como los catalizadores que hacen posible la vida. Sin embargo estas proteínas, además de su función biológica, pueden tener aplicación en otros ámbitos de la ciencia. No hacemos referencia a los usos *in vitro* de las enzimas, como es el caso de la *Taq* polimerasa en el PCR u otras enzimas modificadoras del ADN que se usan en biología molecular. Tampoco nos referimos al uso de enzimas a nivel industrial realizando la misma función que hacen en el organismo, como es la sacarificación del almidón con amilasas. Existen otros usos que se han dado a las enzimas, que difieren mucho de su papel fisiológico, pero que aprovechan sus propiedades catalíticas y de reconocimiento molecular. Estos usos se basan esencialmente en la modificación de sustancias de una manera que en sistemas biológicos no se presenta o bien de modificar compuestos químicos inexistentes en la naturaleza. En este artículo se hace una revisión de la naturaleza de las lipasas, así como de sus principales aplicaciones más allá de la hidrólisis de lípidos en sistemas acuosos.

ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Las lipasas (triacilglicérol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces éster de los triacilglicérols, produciendo ácidos grasos y, dependiendo de la naturaleza de la lipasa y de sus

condiciones de actividad, glicerol y mono- o diacilgliceroles con distintas posiciones finales de esterificación (1). Las lipasas actúan en la interfase agua-lípido, a diferencia de las esterasas que hidrolizan el mismo enlace pero requieren que el sustrato sea soluble en la fase acuosa (2). La actividad lipolítica varía, como con todas las enzimas, al aumentar la concentración del sustrato. Sin embargo, cuando éste es insoluble, su actividad es una función del área de la interfase por unidad de volumen, a esto se le ha denominado "concentración de interfase". Esta forma de medir la concentración de sustrato refleja la acción de la enzima en una interfase y su necesidad de entrar en la fase acuosa y posteriormente adsorberse en la interfase para interactuar con su sustrato (3). Las lipasas han sido caracterizadas de acuerdo a parámetros como el perfil de actividad contra pH, estabilidad y actividad con respecto a la temperatura, especificidad posicional en la hidrólisis de triacilgliceroles y especificidad por ciertos ácidos grasos. La especificidad posicional es una característica importante para la aplicación industrial y analítica de estas enzimas. Las lipasas de *Aspergillus niger*, *Rizhopus delemar*, *Rhizomucor miehei* y *Thermomyces lanuginosa* poseen especificidad para la hidrólisis de ésteres de glicerol en posición 1,3, mientras que lipasas como la de *Geotrichum candidum* y *Penicillium cyclopium* no muestran especificidad. La enzima de *Geotrichum candidum* ha mostrado especificidad para la hidrólisis de lípidos insaturados, mientras que la proveniente de *Fusarium oxysporum* es aparentemente más afín por los ésteres de ácidos grasos saturados (1).

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Varias lipasas han sido clonadas y secuenciadas. Una comparación de sus secuencias hace evidente la existencia de un residuo de serina localizado en una región de residuos hidrofóbicos, que se encuentra muy conservada en todos los casos, un pentapéptido consenso Gly X Ser X Gly, donde X es cualquier aminoácido (1, 2). En las lipasas provenientes del género *Bacillus* el pentapéptido consenso cambia la primera Gly por Ala, Ala X Ser X Gly. Se ha visto que las lipasas de este género poseen un pH de máxima actividad cercano a 10, lo cual las hace atractivas desde un punto de vista químico ya que se pueden usar en condiciones extremas (4).

Las lipasas poseen una estructura característica α/β , esto es, una estructura de hoja β -plegada central con



Figura 1. Estructura cristalina de la lipasa de *Rhizomucor miehei* con una molécula de dietilfosfonato (inhibidor competitivo) unido al sitio activo. La hélice α que se encuentra a la derecha del inhibidor es la tapa del sitio activo; en condiciones de no-inhibición esta hélice se encuentra cubriendo el sitio activo.

hélices α en menor proporción (Fig. 1). En muchas de las lipasas estudiadas por cristalografía de rayos X se ha visto que el sitio catalítico está localizado en el carboxilo terminal de la hoja central. El sitio catalítico de las lipasas presenta un residuo de histidina (His), un residuo ácido como aspartato (Asp) o glutamato (Glu) y un residuo de serina (Ser) que ataca nucleofílicamente al enlace éster de los ácidos grasos durante la catálisis. El residuo de Ser es activado por el acoplamiento entre los residuos Asp e His para hacerlo lo suficientemente nucleofílico. Este mecanismo de reacción es el mismo que se ha observado en el caso de las serinoproteasas, ya que el enlace peptídico resulta ser electrónicamente muy similar al enlace éster. En las lipasas, el residuo de Ser activo es el que se encuentra en la secuencia consenso mencionada anteriormente, aunque el resto de los aminoácidos de la tríada catalítica provienen de distintas regiones de la proteína. La serina encontrada dentro del pentapéptido consenso se encuentra, en el caso de las lipasas, en una conformación ϵ ($\phi = 62^\circ$, $\Psi = -121^\circ$). Esta región consiste en una cadena β seguida por un giro rígido que contiene al residuo de Ser y en seguida un α hélice, motivo estructural conocido como β - ϵ Ser- α (2).

En todas las lipasas hasta ahora estudiadas, el centro catalítico está por debajo de una o más vueltas de hélices α superficiales. En las lipasas esta cubierta consiste en una corta hélice anfipática. En la lipasa de *R. miehei*, bajo condiciones de inhibición competitiva con dietilfosfonato, esta hélice se aleja del sitio activo, a través de la superficie de la molécula moviendo su centro de gravedad 8 Å y girando sobre su propio eje casi 180° (Fig. 1). Como resultado de este movimiento se expone una gran superficie hidrofóbica de aproximadamente 750 Å², donde 12 aminoácidos son responsables de la mayor parte de dicha superficie, Ile85, Trp88, Ile89, Leu92, Phe94, Val205, Leu208, Phe213, Val254, Leu255, Leu258 y Leu267. Cuando se alinean estos aminoácidos con otras lipasas se ve que están altamente conservados, confirmando así su importancia funcional. Este movimiento expone el sitio activo al disolvente y la presencia de la superficie hidrofóbica en la proteína le permite interactuar con la superficie del lípido, haciéndola de este modo mucho más activa frente a ésteres insolubles. La presencia de la interfase lípido-agua produce este fenómeno estructural conocido como "activación interfacial" (2).

En el caso de la lipasa de *T. lanuginosa*, el movimiento de la tapa durante la activación interfacial ha sido bien demostrado y correlacionado con un aumento de 100 veces en la actividad catalítica con respecto a la enzima en condiciones de no activación (3). La lipasa de *Bacillus subtilis* no presenta el fenómeno de activación interfacial, este hecho y su tamaño reducido (29 kDa) hacen suponer que esta enzima no posee el motivo que cubre al sitio activo (4). La activación de lipasas mayores, como la humana pancreática (hpL), presentan un fenómeno más complejo, ya que éstas poseen cofactores como la colipasa para el caso de la hpL. Estudios estructurales mostraron que la colipasa se une exclusivamente al dominio del carboxilo terminal; no obstante, aún no es claro qué cambios conformacionales ocurren durante la adsorción de la enzima en la interfase lípido-agua, dejando a la colipasa en contacto con otras partes de la enzima, incluyendo el motivo que cubre al sitio activo (2).

SÍNTESIS DE ÉSTERES

Existen varias aplicaciones para las lipasas, como la producción de nuevos tipos de triacilglicerolos con características modificadas, como punto de fusión

bajo para las grasas de uso en alimentos sólidos. Esto se logra mediante la transesterificación enzimática de triacilglicerolos disponibles en presencia de bajas cantidades de agua, lo cual desplaza el equilibrio químico en el sentido sintético, para que el producto mayoritario de la reacción sea el de transesterificación. Otra aplicación es la síntesis de otros ésteres como los glicosídicos y tioésteres (1).

Del mismo modo, cuando se ponen a reaccionar en un disolvente orgánico con mínimo contenido de agua, ya que debe existir una fracción finita y pequeña que permanezca unida a la enzima para que ésta funcione, producen la esterificación de alcoholes con ácidos grasos. Estos compuestos son los responsables de los sabores y aromas en muchos productos, por lo que este método se ha propuesto para la producción industrial de saborizantes y aromas aplicables a los alimentos. Un ejemplo de esto es la producción de hexil acetato en *n*-hexano con la lipasa de *R. miehei*. El hexil acetato es un éster de cadena corta con aroma frutal el cual es muy usado como aditivo en la industria alimentaria. Tradicionalmente se extrae de fuentes naturales o se produce por síntesis química. En este caso se transesterificó triacetina con hexanol utilizando la enzima inmovilizada en una resina aniónica variando temperatura, tiempo, contenido de agua y la relación triacetina:hexanol.

Los autores encontraron que los factores que más afectan la conversión molar de hexanol en hexil acetato son la temperatura y la relación triacetina:hexanol. En el estudio obtuvieron hasta un 86.6% de conversión molar de hexanol, lo cual es un excelente rendimiento (5). En este tipo de reacciones el rendimiento es de gran importancia para competir con otros procesos sintéticos. Sobre este punto se ha visto que no todos los ácidos grasos se pueden transesterificar o esterificar con la misma facilidad, es decir, se obtienen rendimientos distintos para ácidos grasos distintos.

Los estudios que se han hecho sobre este tópico demuestran que el número de átomos de carbono del ácido graso es determinante en el rendimiento de la reacción, y además es distinto para diversas lipasas, por ejemplo la de *Pseudomonas cepacia* presenta una gran preferencia por los ácidos grasos de 8 y 16 carbonos, mientras que las de *R. miehei* y *Candida antarctica* sólo por los primeros (6). La lipasa de *C. antarctica* también ha sido usada para la síntesis

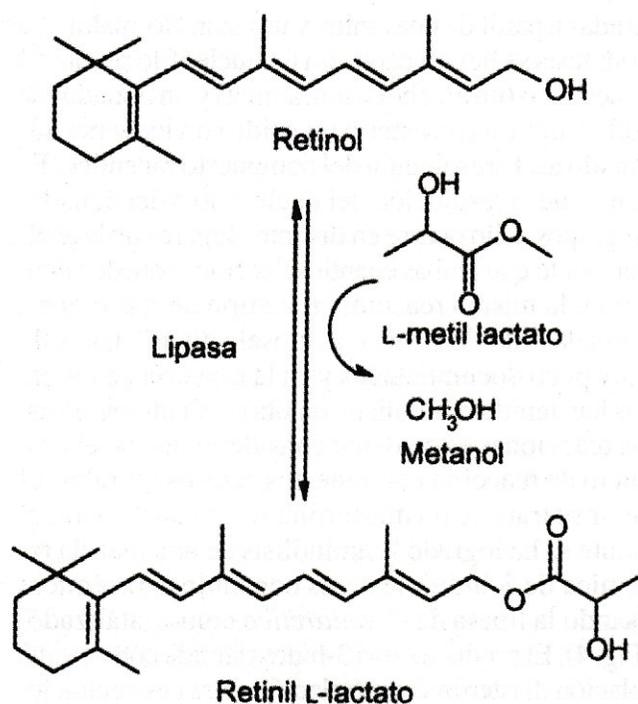


Figura 2. Síntesis enzimática de retinil lactato a partir de L-metil lactato y retinol. La transesterificación se lleva a cabo en disolvente orgánico y es catalizada por la lipasa de *C. antarctica*.

de ésteres de ácido ascórbico y de retinol (Fig. 2). Estas vitaminas han sido empleadas en el tratamiento del envejecimiento de la piel, cáncer de ésta y otros padecimientos epidérmicos dada su función antioxidante. Sin embargo, la aplicación tópica de vitaminas causa frecuentemente irritación en la piel. Para resolver este problema muchos autores han conjugado a las vitaminas con ácidos carboxílicos, especialmente α - y β -hidroxiácidos, como el L-láctico, glicólico y salicílico. Tales ácidos aparentemente poseen propiedades terapéuticas para la piel. Sin embargo, al ser aplicados en cremas con concentraciones mayores al 5% o en individuos sensibles, también pueden resultar irritantes. Se cree que los ésteres de vitaminas se hidrolizan *in vivo*, haciendo disponibles tanto al ácido como a la vitamina y tienen la ventaja de no ser irritantes y ser fácilmente absorbidos. El retinil lactato y el ascorbil lactato se han sintetizado en varios disolventes orgánicos, obteniendo rendimientos de 90 y 80%, respectivamente (7).

Otros ésteres importantes en el ámbito industrial son los de compuestos esteroideos, que pueden ser usados en pantallas de cristal líquido, cosméticos,

nutracéuticos y medicamentos. Se ha visto que son efectivos en la reducción de colesterol sanguíneo al inhibir la absorción de éste a nivel de intestino delgado. Es posible la síntesis química de tales compuestos; sin embargo, utilizando disolventes orgánicos y lipasas como biocatalizadores, se ha logrado la producción de ésteres de esteroides, estanoles y esteroides. Un estudio interesante, en el que se utilizó lipasa de *Candida rugosa* como catalizador, presenta la síntesis de ésteres de sitosterol, colesterol, estigmasterol, ergosterol, 7-dehidrocolesterol y sitostanol. Estos fueron preparados en ausencia de agua y con disolventes orgánicos. La reacción se llevó a cabo en la mezcla de ácidos grasos a 40°C y en condiciones de vacío (20 a 40 mbar), agregando directamente la enzima inmovilizada. El rendimiento bajo estas condiciones fue muy cercano al 100% (8).

RESOLUCIÓN DE MEZCLAS RACÉMICAS Y SÍNTESIS ENANTIOSELECTIVAS

Las lipasas y las esterasas pueden utilizarse para la síntesis estereoquímica de ésteres. Estos ésteres estereoespecíficos son muy útiles en la industria farmacéutica y química, como por ejemplo el Naproxen®, Ketoprofen® y muchos intermediarios tanto de síntesis de medicamentos como de insecticidas y herbicidas (9). Los profenos (ácidos 2-arilpropiónicos) son un importante grupo de compuestos con propiedades analgésicas y anti-inflamatorias, de tipo no esterooidal, que ejercen su acción farmacológica a través de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. El enantiómero (S) de estos compuestos es el que posee la actividad farmacológica, mientras que su contraparte, el isómero (R), puede ser hasta 160 veces menos potente. El mayor problema de los profenos es el daño que pueden producir en el estómago humano debido al grupo ácido que poseen. Una manera de enmascarar este efecto colateral es ocultando tal grupo al esterificarlo con un alcohol, generando así un pro-fármaco que posteriormente será hidrolizado *in vivo* liberando al profeno, permitiendo entonces que éste ejerza su acción terapéutica. Utilizando la lipasa inmovilizada de *Candida rugosa* se ha logrado resolver una mezcla racémica de (R, S)-ibuprofeno y a su vez sintetizar un pro-fármaco, 2-N-morfolinetil (S)-ibuprofeno (Fig. 3). En este proceso se modifica sólo al enantiómero (S), cambiando sus propiedades fisicoquímicas y permitiendo separarlo del enantiómero (R) por métodos convencionales (10).

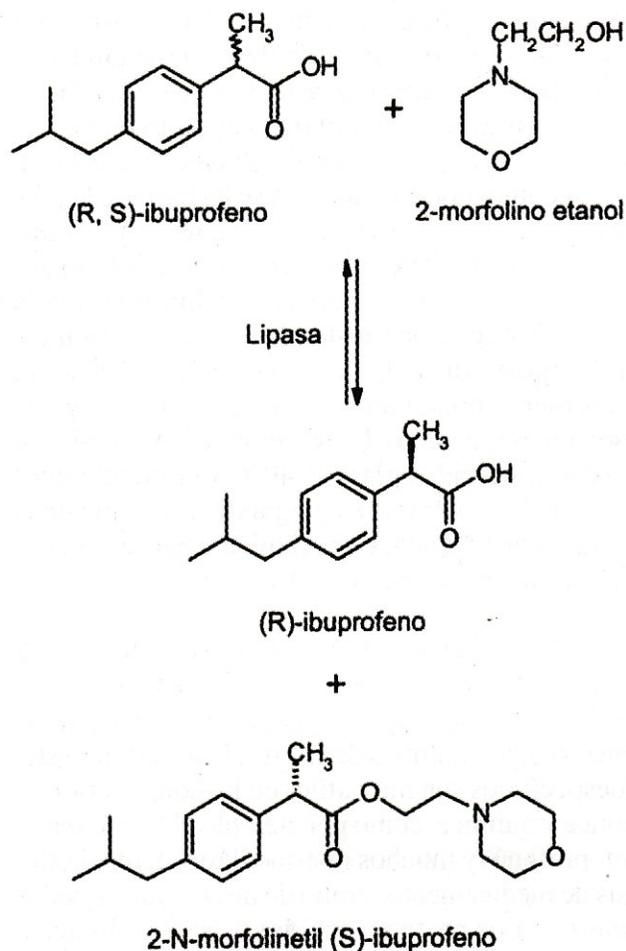


Figura 3. Resolución de una mezcla racémica de ibuprofeno a través de la formación enantioselectiva de un éster. La lipasa de *C. rugosa* se usó como catalizador.

Estas síntesis enantioselectivas de ésteres ha permitido también la preparación de compuestos con aroma y sabor muy usados en la industria alimentaria, un caso es el metil-éster del ácido (S)-2-metilbutanoico. Este compuesto es el principal responsable del sabor y aroma de las manzanas y las fresas. La síntesis química de este compuesto es muy cara y produce una mezcla racémica en la que sólo el enantiómero (S) posee las propiedades sensoriales señaladas, razón por la que se ha investigado su síntesis enantioselectiva en medio orgánico con varias lipasas. Los mejores rendimientos hasta el momento han sido relaciones 3:1 del enantiómero (S) al (R) con las lipasas de *R. miehei*, *A. niger* y *A. javanicus*. Aunque parece no muy bueno, el proceso es bastante mejor y más barato que la síntesis química (11).

Las lipasas en disolventes orgánicos también catalizan reacciones de aminólisis, esto es la síntesis de

amidas a partir de una amina y un éster. Normalmente la síntesis se lleva a cabo con un nucleófilo proquiral o racémico (un alcohol o una amina) y un donador de acilos aquiral (un éster o un ácido) o viceversa, logrando así la resolución del compuesto racémico. Es claro que la resolución del nucleófilo o del donador de grupos acilo ocurre en distintos lugares de la enzima, por lo que ambas enantioselecciones pueden ocurrir en la misma reacción. Este tipo de reacciones, llamadas “doblemente enantioselectivas”, han sido muy poco documentadas y en la mayoría de los casos han tenido rendimientos pobres. El interés en estas reacciones es evidente considerando que el producto de reacción contiene dos centros quirales, es decir se trata de un diastereómero. En un trabajo reciente se ha logrado la aminólisis de una mezcla racémica de 3-hidroxiésteres con aminas racémicas usando la lipasa de *C. antarctica* como catalizador (Fig. 4). El producto, una 3-hidroxiamida con una alta relación diastereomérica (relación entre concentraciones de los diastereómeros), es usado como materia prima en la síntesis de otros compuestos de interés (12).

SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE POLÍMEROS

Las lipasas también han sido utilizadas en el campo de la síntesis de polímeros ópticamente activos. Este tipo de macromoléculas ha llamado la atención como materiales funcionales para catálisis quiral usada en síntesis asimétrica, también como material de empaque para columnas cromatográficas para la separación de enantiómeros y como materiales quirales para

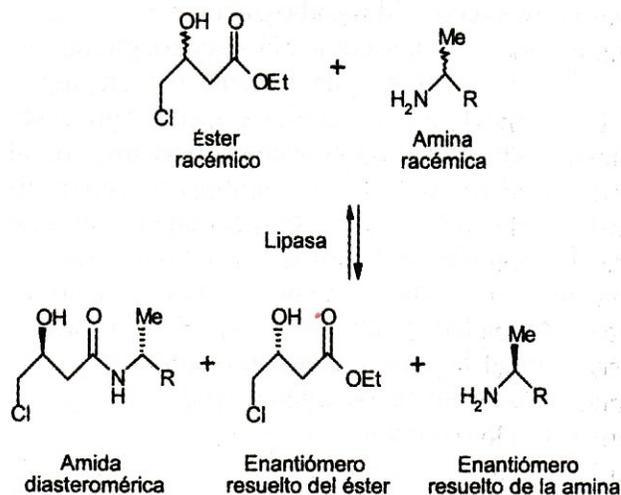


Figura 4. Aminólisis doblemente selectiva partiendo de ésteres y aminas, ambos racémicos. La reacción es catalizada por la lipasa de *C. antarctica* en disolvente orgánico.

la preparación de polímeros para cristales líquidos. Por estas razones, la polimerización asimétrica ha sido estudiada intensamente con el fin de introducir quiralidad a la estructura polimérica. En este tipo de síntesis, un isómero de un monómero racémico es preferencialmente polimerizado, generando un polímero ópticamente activo. Recientemente, se ha reportado que es posible la copolimerización enantioselectiva de lactonas para la producción de poliésteres ópticamente activos. Se realizó la copolimerización de una mezcla racémica de β -butirolactona con 12-dodecanólido (Fig. 5). El enantiómero (S) reaccionó preferencialmente produciendo el copolímero enriquecido con este enantiómero. La propia β -butirolactona también ha sido polimerizada para la generación de poli 3-hidroxibutirato en forma lineal y cíclica (13).

La existencia de polímeros de estructura bien definida y con grupos funcionales estratégicamente colocados permite su empleo en diversas áreas, como la inmovilización de enzimas u otros catalizadores y para adsorción/desorción de fármacos permitiendo su liberación controlada en largos periodos de tiempo, entre otros posibles usos. Los policarbonatos tienen estas propiedades y además son biodegradables, razón por la cual existe un gran interés en la síntesis de estos polímeros. Un ejemplo de esto es el policarbonato generado a partir de la polimerización de 5-metil-5-benziloxycarbonil-1,3-dioxan-2-ona catalizada por la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* a 80°C. El producto es un policarbonato soluble en agua, con peso molecular de 6100 Da, que posee grupos carboxílicos que pueden ser utilizados para la unión de otras moléculas con diversos fines (14).

Del mismo modo en que las lipasas pueden participar en la síntesis de poliésteres, pueden participar en su degradación en disolventes orgánicos. La descomposición de polímeros sintéticos ha sido una de las grandes preocupaciones sociales dado su potencial contaminante. Hasta ahora los procesos químicos de reciclado de polímeros han requerido mucha energía y su eficiencia ha sido limitada. Los polímeros biodegradables como los poliésteres alifáticos son una alternativa a los plásticos tradicionales pobremente o no-biodegradables, como son el polietileno o el polipropileno. En estudios recientes se ha estudiado la depolimerización de policaprolactona utilizando la lipasa de *C. antarctica*. Tales estudios demuestran

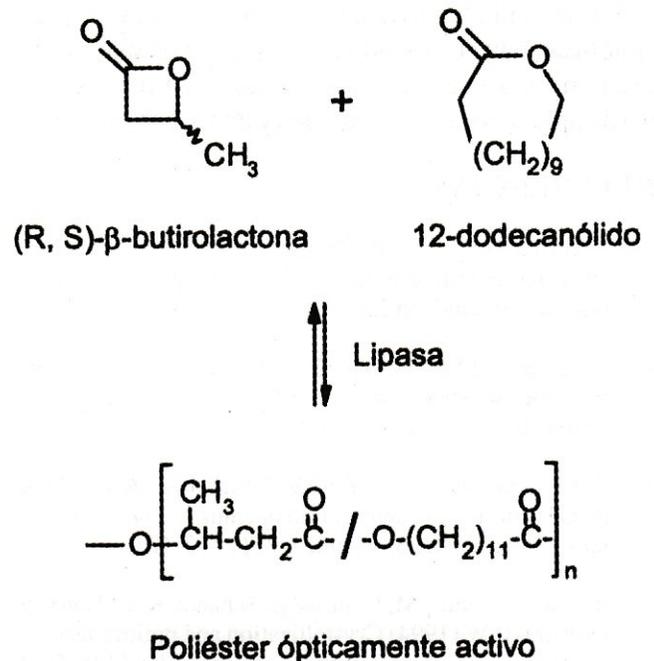


Figura 5. Copolimerización de (R, S) β -butirolactona y 12-dodecanólido para la producción de un poliéster ópticamente activo. La reacción es catalizada por la lipasa de *C. antarctica* en diisopropil éter.

que la enzima degrada el polímero hasta pesos moleculares menores a 500 Da al realizar la reacción en tolueno a 60 °C. También se demostró que la presencia del disolvente modificaba el equilibrio químico entre la forma depolimerizada y la forma polimerizada de la caprolactona utilizando la misma lipasa como catalizador, un avance significativo en el reciclado de plásticos (15).

CONCLUSIÓN

Las lipasas son enzimas sumamente versátiles tanto en hidrólisis como en síntesis. Su capacidad catalítica en agua y en disolventes orgánicos las ha convertido en una herramienta indispensable en química orgánica para la síntesis de diversos compuestos con actividad farmacológica, cosmética y nutricional; en investigación, para la síntesis de compuestos que difícilmente se podrían obtener por síntesis química; en la industria de sabores, para la producción de ésteres aromáticos y saborizantes así como hidrolizados de grasa que pueden recrear sabores de productos que requieren maduración, como quesos y carnes. Existen muchas otras aplicaciones potenciales de las lipasas. El gran reto es identificar tales aplicaciones y seleccionar la lipasa más apta para el proceso, ya sea por análisis y selección o por ingeniería de proteínas.

La capacidad hidrolítica así como sus propiedades sintéticas, han convertido a las lipasas en enzimas de gran importancia económica dado su amplio espectro de aplicaciones comerciales y en investigación.

REFERENCIAS

1. Godtfredsen S E (1990) Microbial lipases. En: Microbial enzymes and biotechnology. Elsevier Applied Science. Northern Ireland. pp 255-274.
2. Derewenda Z S y Sharp A M (1993) News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem Sci* 18: 20-25.
3. Cajal Y, Svendsen A, Girona V, Patkar S A y Alsina M A (2000) Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase. *Biochemistry* 39: 413-423.
4. Ransac S, Blaauw M, Lesuisse E, Schanck K, Colson C y Dijkstra, B W (1994) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a lipase from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 238: 857-859.
5. Shieh C y Chang S (2001) Optimized synthesis of lipase-catalyzed hexyl acetate in n-hexane by response surface methodology. *J Agric Food Chem* 49: 1203-1207.
6. Lee C y Parkin K L (2000) Comparative fatty acid selectivity of lipases in esterification reactions with glycerol and diol analogues in organic media. *Biotechnol Prog* 16: 372-377.
7. Maugard T, Tudella J y Legoy M D (2000) Study of vitamin ester synthesis by lipase-catalyzed transesterification in organic media. *Biotechnol Prog* 16: 358-362.
8. Weber N, Weitkamp P y Mukherjee K D (2001) Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst. *J Agric Food Chem* 49: 67-71.
9. Hou C T (1993) Screening of microbial esterases for asymmetric hydrolysis of 2-ethylhexyl butyrate. *J Indust Microbiol* 11: 73-81.
10. Chen J y Tsai S (2000) Enantioselective synthesis of (S)-ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on accurel MP1000. *Biotechnol Prog* 16: 986-992.
11. Kwon D Y, Hong Y y Yoon S H (2000) Enantiomeric synthesis of (S)-2-methylbutanoic acid methyl ester, apple flavor, using lipases in organic solvent. *J Agric Food Chem* 48: 524-530.
12. Sánchez V M, Rebolledo F y Gotor V (1999) *Candida antarctica* lipase-catalyzed doubly enantioselective aminolysis reactions. Chemoenzymatic synthesis of 3-hydroxypyrrolidines and 4-(silyloxy)-2-oxopyrrolidines with two stereogenic centers. *J Org Chem* 64: 1464-1470.
13. Kikuchi H, Uyama H y Kobayashi S (2000) Lipase-catalyzed enantioselective copolymerization of substituted lactones to optically active polyesters. *Macromolecules* 33: 8971-8975.
14. Al-Azemi T F y Bisht K S (1999) Novel functional polycarbonate by lipase-catalyzed ring-opening polymerization of 5-methyl-5-benzyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-one. *Macromolecules* 32: 6536-6540.
15. Kobayashi S, Uyama H y Takamoto T (2000) Lipase-catalyzed degradation of polyesters in organic solvents. A new methodology of polymer recycling using enzyme as catalyst. *Biomacromolecules* 1: 3-5.

FOSFOLIPASA C ESPECÍFICA DE FOSFOINOSÍTIDOS, ESTRUCTURA Y PAPEL EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Samuel Lara González y Gabriela M. Montero Morán. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Apartado Postal 70-159, 04510 D.F., México. Tel.: 5623-2168, Fax: 5616-2419. Correo electrónico: samuel@servidor.unam.mx

Recibido: 11 de diciembre de 2000. Aceptado: 22 de mayo de 2001.

RESUMEN

Las fosfolipasas C específicas de fosfoinosítidos (PLC-PI) forman parte de una gran familia de enzimas estrechamente relacionadas que se asocian reversiblemente a la membrana, donde llevan a cabo la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5) P_2). En este proceso se generan dos segundos mensajeros: 1) el diacilglicerol (DAG), que activa a una enzima que se encuentra unida a la membrana denominada proteína cinasa C, la cual a su vez fosforila a varias proteínas; y 2) el inositol-1,4,5-trisfosfato (Ins(1,4,5) P_3), que difunde a través del citosol hasta el retículo endoplásmico donde promueve la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol, estimulando una gran variedad de procesos celulares. Las fosfolipasas bacterianas, a diferencia de las de mamíferos, no pueden hidrolizar los fosfatidilinositales fosforilados y presentan un tipo de regulación diferente. Las PLC-PI emplean un arreglo modular en dominios para lograr una producción regulada de Ins(1,4,5) P_3 y DAG. Estos módulos se conocen como dominios PH, EF, C2, y catalítico. Los dominios PH y C2 son comunes en proteínas que interactúan con membranas y que participan en la transmisión de señales. La presente revisión se propone dar una visión estructural y funcional de las PLC-PI, así como mostrar su papel en la transmisión de señales y su regulación *in vivo*.

PALABRAS CLAVE: Fosfolipasa C, transducción de señales, dominio C2, dominio PH.

ABSTRACT

The phosphoinositide-specific phospholipases C (PLC-PI) are a large family of closely related enzymes that reversibly associate with membranes to carry out the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate substrates (PtdIns(4,5) P_2), to generate two

second messengers: i) diacylglycerol (DAG), which mediates the activation of protein kinase C and ii) inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5) P_3) that diffuses across the cytosol up to the endoplasmic reticulum (ER) where it stimulates Ca^{2+} release to the cytosol. Both Ca^{2+} and DAG are involved in many processes, like cellular proliferation, contraction, excitation and secretion. In contrast, the bacterial enzymes can not hydrolyse phosphorylated phosphoinositides and they use a different mechanism of regulation. The mammalian isozymes employ a modular arrangement of domains to achieve a regulated production of the two key second messengers. The PH and C2 domains are common in proteins that interact with membrane and are involved in signal transduction pathways. The purpose of the present review is to provide an structural and functional view of the PLC-PI in the signal transduction pathway and its regulation *in vivo*.

KEY WORDS: Phosphoinositide phospholipase C; signal transduction, C2 domain, PH domain.

INTRODUCCIÓN

Todas las reacciones bioquímicas que se realizan en nuestro organismo y en cada célula son reguladas estrictamente. Un ejemplo bien conocido es la regulación de la síntesis y degradación del glucógeno. La glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa, enzimas que se encargan de la degradación y síntesis del glucógeno respectivamente, son reguladas por una cascada bicíclica de señales a través de la cual la actividad de ambas enzimas cambia entre un estado activo y uno inactivo y viceversa, conforme son modificadas covalentemente por reacciones de fosforilación o desfosforilación. En esta cascada de señales participan otras enzimas, como la fosforilasa cinasa, la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico.

co y la fosfoproteína fosfatasa-1. Esta cascada de señales comienza con la secreción de hormonas: como el glucagón o la insulina, que al alcanzar al hígado promueven una serie de señales cuyos efectos finales son activar la degradación o la síntesis de glucógeno, respectivamente.

Como podemos imaginarnos, las cascadas de señales que se originan con la síntesis de una hormona, factor de crecimiento, neurotransmisor, u otra señal, requieren que las células blanco sean capaces de reconocer a esta señal. Las proteínas que cumplen con esta función en la célula se conocen de forma general como receptores de membrana. Los receptores son proteínas de membrana que unen específicamente moléculas extracelulares como las antes mencionadas. Estos receptores transmiten al interior de la célula una señal que promueve una respuesta específica; por ejemplo, los efectos intracelulares de la mayoría de los péptidos y de las hormonas catecolaminas están mediados por mensajeros secundarios tales como el AMPc.

Las señales extracelulares causan a menudo un incremento transitorio en la concentración de Ca^{2+} citosólico, que a su vez, activa una gran variedad de enzimas por medio de la calmodulina y sus homólogos. La primera evidencia de la naturaleza de esta señal (incremento de Ca^{2+}) surgió de la observación de que la movilización intracelular de Ca^{2+} y la tasa de recambio del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5) P_2) están estrechamente correlacionadas. El PtdIns(4,5) P_2 es un componente minoritario de la parte interna de la membrana plasmática. Con base en estas observaciones, Robert Mitchell propuso en 1975 que la hidrólisis de PtdIns(4,5) P_2 estaba asociada de alguna manera con la liberación de Ca^{2+} . Posteriormente se demostró que el PtdIns(4,5) P_2 es el precursor de un par de segundos mensajeros de gran importancia: el inositol 1,4,5-trisfosfato (Ins(1,4,5) P_3) y el sn-1,2-diacilglicerol (DAG). Este par de segundos mensajeros se producen por efecto de diferentes factores polipeptídicos de crecimiento, entre otros el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que actúa movilizándolo al Ins(1,4,5) P_3 y al DAG, que, a su vez, estimulan la proliferación celular.

La enzima que participa directamente en la producción de este par de segundos mensajeros es la

fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos (PLC-PI). La cual abarca una familia de isoenzimas de las que se conocen a la fecha un total de 10 en mamíferos, y que se les clasifica en tres tipos diferentes: δ , β y γ . Esta familia de isoenzimas cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato generando dos productos: el inositol-1,4,5-trisfosfato que se libera al citosol y el diacilglicerol que permanece en la membrana. Simultáneamente, la actividad de la PLC-PI también regula la concentración de PtdIns(4,5) P_2 afectando la actividad de otras enzimas que dependen de esta molécula como la fosfoinositol 3-cinasa (2).

El Ins(1,4,5) P_3 es hidrosoluble y difunde a través del citosol hasta el retículo endoplásmico (RE), donde se une a un receptor específico y estimula la liberación de Ca^{2+} , que a su vez, estimula una variedad de procesos celulares. Por ejemplo, en células B, concentraciones elevadas de Ca^{2+} citosólico promueven, por un lado, la desfosforilación del factor NF-AT (factor nuclear de células T activadas) catalizada por la enzima calcineurina fosfatasa, lo que a su vez activa eventos transcripcionales. Otro efecto de los niveles elevados de Ca^{2+} está relacionado con las proteínas NF- κ B (factor nuclear κ B), c-Rel y Rel-A, que son trasladadas al núcleo, donde se encargan de regular el proceso de transcripción (1).

Por su naturaleza apolar el DAG se ve obligado a permanecer en el plano de la membrana plasmática, donde también actúa como un segundo mensajero activando a la proteína cinasa C. Esta enzima, que está unida a membrana, a su vez fosforila a diferentes proteínas y enzimas, modulándoles su actividad. Entre estas enzimas se encuentran la glucógeno sintetasa y las cadenas ligeras de la miosina del músculo liso. El Ins(1,4,5) P_3 y el DAG tienen una vida media muy corta y son reciclados rápidamente para formar PtdIns(4,5) P_2 , a través de una vía metabólica bicíclica.

Esta doble vía de señales (Ca^{2+} y DAG) ejerce control sobre muchas respuestas celulares, incluyendo, proliferación celular, contracción muscular, producción de superóxido, respuesta inflamatoria, y los procesos de excitación y secreción.

La importancia de esta familia de enzimas PLC-PI se ha demostrado en estudios realizados en ratón. La

eliminación homocigótica del gen *Plcg1* (que codifica para la enzima PLC-PI- γ 1) (*Plcg1^{-/-}*) promueve la muerte del embrión a la edad de 9 días, mientras que los animales heterocigóticos (*Plcg1^{+/-}*) son normales. Los 4 genes PLC-PI- β han sido alterados en ratón. La delección homocigótica de tres de ellos genera fenotipos intermedios, mientras que la delección del gen β -3 es letal para el embrión (3).

Resulta interesante que se puedan obtener fibroblastos inmortalizados de ratones sólo con abortar la expresión de la PLC-PI- γ . En estas células la única deficiencia que se ha observado hasta ahora es en la activación de fosfolipasa D y en la fosforilación de Tiam1 (factor de intercambio para Rac1) (3).

El papel de las PLC-PI en los procesos inflamatorios es importante. La expresión de la PLC-PI- β 2 es regulada durante el desarrollo y se expresa en el linaje de células hematopoyéticas. Para los neutrófilos, el péptido interleucina-8 (IL-8) es un potente agente quimiotáctico que promueve la movilización de estas células del torrente sanguíneo a los sitios de inflamación. La IL-8 se une a su receptor IL-8R α , el cual interactúa con la proteína G heterotrimérica, causando que se libere su subunidad $\beta\gamma$, que posteriormente activa a la PLC-PI- β 2 (4). Tanto las subunidades G α_{16} y G $\beta\gamma$ pueden actuar cooperativamente para activar a la PLC-PI- β 2. Esta acción sinérgica de activación de múltiples vías puede producir un rápido aumento en la producción de segundos mensajeros, asociados a la inducción de la respuesta inflamatoria (4).

Se ha observado también que la exposición a campos electromagnéticos (CE), por ejemplo líneas de alta tensión y cableado o redes eléctricas, agudizan la leucemia, promoviendo la proliferación celular, la sobrevivencia o programas de diferenciación celular. Se ha demostrado que el delicado balance en la proliferación de las células B linfoides puede ser alterado por la activación inducida por CE de la cascada de señales relacionada con la cinasa LYN (5). Las células expuestas a CE presentan un rápido incremento en la producción de Ins(1,4,5) P_3 debido a la activación de PLC-PI- γ 2, observándose elevadas concentraciones de este metabolito apenas después de 1 min de iniciada la exposición a CE, estos cambios se acompañan de la activación de la proteína cinasa C (5).

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS PLC-PI

Todas las isoenzimas de la PLC-PI presentan la organización básica que encontramos en las PLC-PI de tipo δ : en el extremo N-terminal tienen un dominio homólogo al descrito por primera vez en la pleckstrina (PH) y que ha sido reportado en más de 100 proteínas diferentes. Enseguida presentan un dominio EF, el dominio catalítico y en el extremo C-terminal el dominio C2 (Fig. 1A). Poco se conoce sobre el mecanismo de regulación de las isoenzimas de la familia δ . Las isoenzimas β presentan una extensión C-terminal de alrededor de 400 residuos y son activadas por asociación a las subunidades α y $\beta\gamma$ de la proteína heterotrimérica G (Fig. 1B). Las isoenzimas γ tienen una inserción de alrededor de 500 residuos, que forman parte de un arreglo multidominio (un dominio PH separado por dos dominios SH2 y uno SH3) insertado en medio de las dos mitades del dominio catalítico (Fig. 1C). Las isoenzimas γ son reguladas por cinasas de residuos de tirosina, en respuesta a factores de crecimiento y estimulación antigénica (2, 3).

Sólo se conoce la estructura tridimensional de la PLC-PI- δ , la cual fue determinada en dos partes: el dominio PH N-terminal de forma aislada e independiente (6) y el resto de la proteína: dominios EF, catalítico y C2 (7) (Fig. 2A, 2B). Esta enzima comprende 4 dominios, el dominio catalítico y módulos accesorios: un dominio PH, un dominio EF y un dominio C2. Estos módulos accesorios están presentes en una gran variedad de proteínas involucradas en la transducción de señales (8).

Con base en el análisis de secuencia es posible deducir la organización de los dominios para todas las PLC-PI. La enzima más simple la encontramos en procariotes y consiste sólo de un barril α/β catalítico. Las PLC-PI han desarrollado dominios accesorios que les permiten regular la hidrólisis de PtdIns(4,5) P_2 . El dominio EF, el dominio catalítico y el dominio C2 forman una estructura muy compacta (altamente empaquetada), conocida como núcleo activo y es común en todas las PLC-PI de eucariotes. Junto al núcleo activo, en el extremo N-terminal, todas las enzimas poseen el dominio PH, con excepción de las de plantas y la de la retina de mamíferos (8).

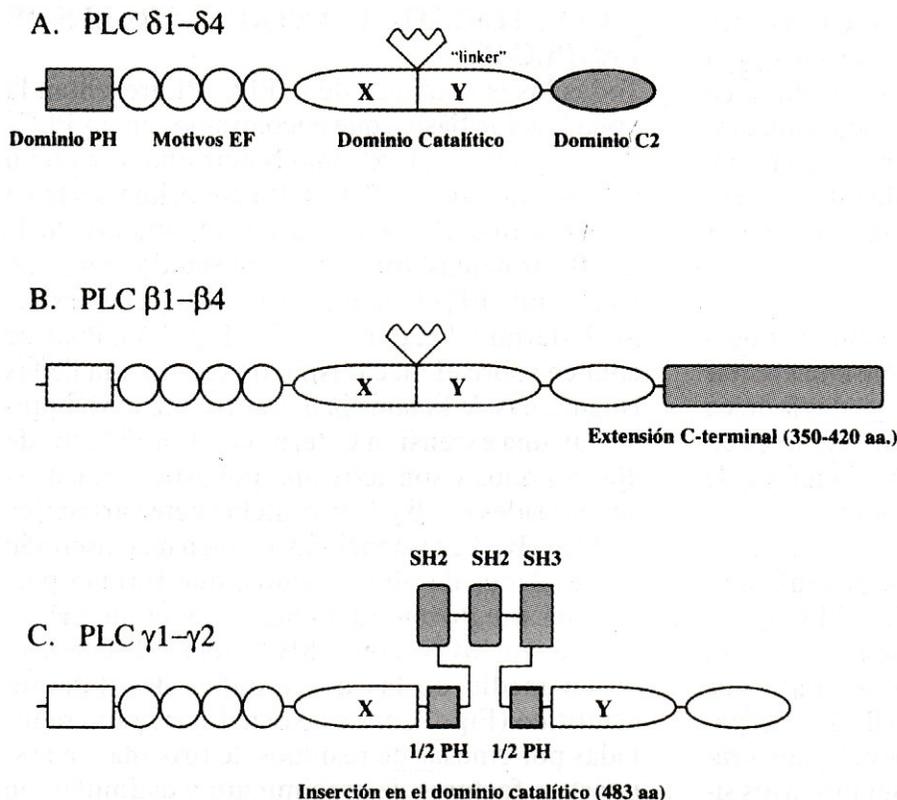


Figura 1. Representación en bloques de los tres tipos de fosfolipasa C específicas de fosfoinosítidos. A) PLC-PI- δ 1- δ 4 donde se señalan los dominios comunes a toda la familia de isoenzimas. B) PLC-PI- β 1- β 4 señalando la extensión C-terminal que distingue a este tipo de isoenzimas. C) Se muestra la inserción en el dominio catalítico entre las regiones X e Y de los dos dominios SH2 y el dominio SH3 propios de las isoenzimas PLC-PI- γ 1- γ 2.

ORGANIZACIÓN EN DOMINIOS DE LAS ISOENZIMAS PLC-PI

El dominio PH

Este dominio, descrito por primera vez en la proteína pleckstrina, comprende alrededor de 120 residuos acomodados en una estructura tipo barril de siete cadenas β antiparalelas. La mitad del barril está constituida por una hoja de tres cadenas y la otra mitad por una hoja de cuatro cadenas- β y una hélice- α C-terminal (Fig. 2A). Se piensa que la función que tiene este tipo de dominio en las proteínas que lo presentan es la de facilitar la asociación a la membrana (2).

Se ha demostrado que el dominio PH de la PLC-PI es responsable del anclaje a la membrana por su interacción con $\text{PtdIns}(4,5)P_2$. Sólo el dominio PH de la PLC-PI- δ 1 ha sido estudiado en términos de las propiedades de unión a fosfolípidos. Tiene una alta afinidad y se une específicamente al $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ y al $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ (Tabla I). El dominio PH es necesario para el anclaje a la membrana plasmática *in vivo*

(9). La PLC-PI- δ 1 une al $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ por interacciones estereoespecíficas con los fosfatos 4- y 5- y tiene algunas interacciones con el fosfato 1-. La unión involucra la cara de carga positiva del dominio PH abarcando las asas β 1- β 2 y β 3- β 4. (8). Dado que los residuos que unen al $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ no se encuentran estrictamente conservados ni siquiera entre las isoenzimas PLC-PI- δ , esto sugiere que la alta afinidad por $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ es única del dominio PH de la PLC-PI- δ 1.

Se ha demostrado que el dominio PH de la PLC-PI- γ 1 une el $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ con suficiente afinidad para translocar a la enzima a la membrana. El análisis de la secuencia del dominio PH de las PLC-PI- β sugiere que éstas no son capaces de establecer las mismas interacciones con los fosfoinosítidos como la PLC-PI- δ 1. El dominio PH de las PLC-PI- β 1 y β 2 se une

fuertemente y de forma inespecífica a las membranas de lípidos neutros, como la fosfatidilcolina, además esta unión no es afectada por la adición de $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ (Tabla I). En las PLC-PI- β el dominio PH y la secuencia que le sigue inmediatamente son esenciales para la interacción y la estimulación por la subunidad $G\beta\gamma$ (2).

El dominio EF

El dominio EF de la PLC-PI- δ 1 consiste en cuatro motivos hélice-asa-hélice organizados en dos lóbulos, de forma similar a la calmodulina. La mayoría de las PLC-PI no han conservado los residuos de unión a Ca^{2+} . Solamente algunas PLC-PI tienen los residuos típicos de unión a Ca^{2+} en las asas de su dominio EF: las PLC-PI- δ los presentan sólo en el lóbulo N-terminal. El análisis de secuencia sugiere que todas las PLC-PI tienen cuatro motivos EF. Parece ser que los dos lóbulos tienen una función muy diferente e independiente. El primer lóbulo funciona como una unión flexible con el dominio PH N-terminal, mientras

que el segundo lóbulo tiene un papel estructural importante. El segundo lóbulo interacciona con el dominio C2 en una forma análoga en la que la calmodulina une su péptido blanco (8).

El dominio catalítico

Se trata de un barril distorsionado (β/α) compuesto de 8 cadenas- β y de 7 hélices- α . Este dominio presenta una región ensanchada entre las cadenas- β 4 y 5. En esta zona el patrón alternativo cadena- β hélice- α está interrumpido por una secuencia conocida como "linker", secuencia de unión o enlazadora, que une las dos mitades del barril catalítico. Cada una de estas mitades son conocidas como regiones de homología X y Y, la región X es la más conservada entre las diferentes PLC-PI de mamíferos así como entre las diferentes especies.

Esta enzima puede usar como sustratos al PtdIns(4,5) P_2 , al fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns(4)P) y fosfatidilinositol (PtdIns), pero los utiliza preferentemente en el siguiente orden: PtdIns(4,5) P_2 > PtdIns(4)P > PtdIns, (Tabla I). Esto como consecuencia de varias interacciones salinas entre el grupo 4- y 5- fosfato del PtdIns(4,5) P_2 con un grupo de residuos básicos (Lys 438, Lys 440, y Arg 549) en el sitio activo (2) (Fig. 2D).

La hidrólisis catalítica del sustrato se da en dos etapas y requiere de Ca^{2+} como cofactor. El cofactor hace una interacción directa con el OH-2 del sustrato y su función es la de bajar su pK_a facilitando su desprotonación antes del ataque nucleofílico sobre el fosfato-1. El Ca^{2+} también neutraliza la carga negativa presente en el estado de transición de la reacción. Esta interacción adicional

del Ca^{2+} explica por qué la enzima tiende a retener el intermediario cíclico en el sitio activo y completar la segunda etapa de la reacción generando un producto acíclico. Como residuos catalíticos participan dos histidinas, la histidina 311 y la histidina 356 (2).

La estructura de la PLC-PI- $\delta 1$ muestra una cresta hidrofóbica rodeando uno de los extremos del sitio activo (Fig. 2D). Se ha propuesto que esta región es la parte de la enzima que penetra dentro de la membrana durante la catálisis. Sin embargo, se ha observado también que mutantes en las que se sustituyeron

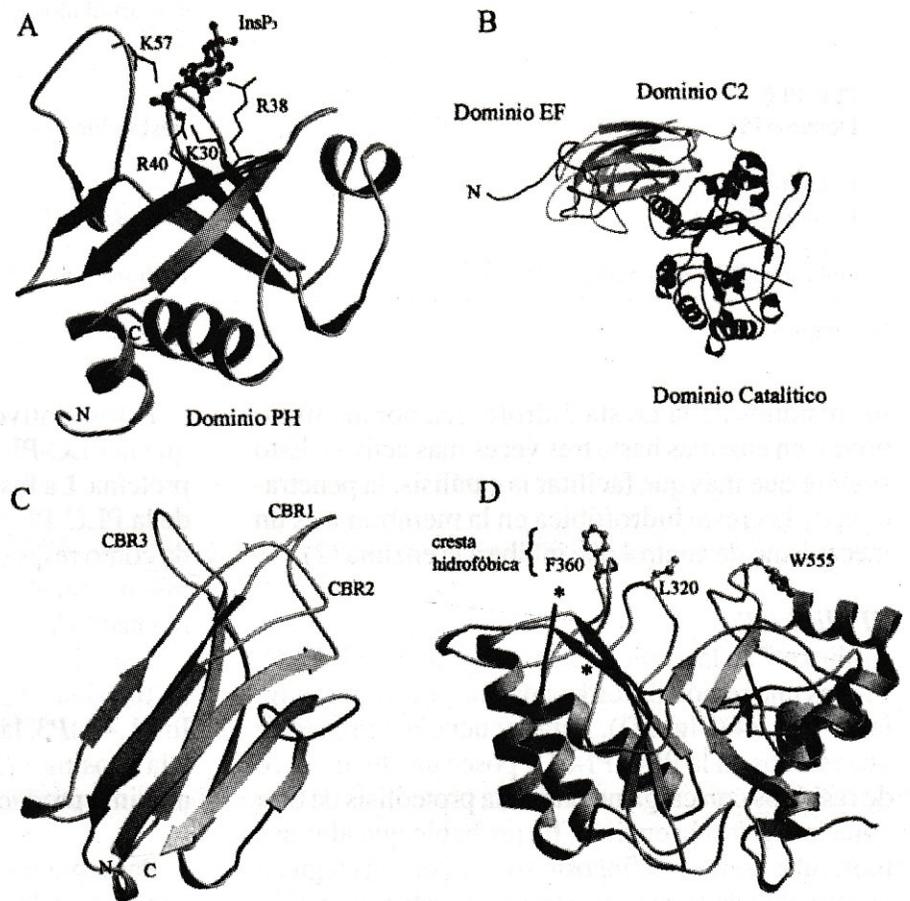


Figura 2. Representación gráfica de la estructura tridimensional de la PLC-PI- $\delta 1$ de rata (pdb 1MAI y 2ISD). A) Dominio PH de la PLC-PI- $\delta 1$, determinado en forma aislada del resto de la proteína. Se muestran los residuos básicos cuyas cadenas laterales son esenciales en la unión del Ins(1,4,5) P_3 (K30, R38, R40 y K57). B) Estructura del resto de la PLC-PI- $\delta 1$ obtenida en forma independiente del dominio PH. C) Representación detallada del dominio C2 en la que se señalan los sitios de unión a Ca^{2+} (CBR's). D) Representación detallada del dominio catalítico, se señalan los residuos de la cresta hidrofóbica. En negro y con asteriscos (*) se señala la región del "linker" entre las regiones X e Y. Estas imágenes se realizaron con el programa Molscript (11) y se terminaron con el programa Raster3D (12). Los extremos amino y carboxilo se indican con N y C respectivamente. Se señala al Ins(1,4,5) P_3 como: Ins P_3 .

TABLA I

LIGANDOS PARA LOS DOMINIOS DE ALGUNAS ISOENZIMAS DE LA PLC-PI

ISOENZIMA	LIGANDO
PLC-PI- δ 1 Dominio PH	Ins(1,4,5) P_3 $K_d = 0.2 \mu\text{M}$ PtdIns(4,5) P_2 $K_d = 1.7 \mu\text{M}$
Dominio catalítico	PtdIns(4,5) P_2 ¹ > PtdIns(4) P^1 > PtdIns ¹ $K_d > 0.1 \text{mM}$ para PtdIns(4,5) P_2 Ca^{2+}
Dominio C2	Fosfatidil serina Fosfatidil inositol Ca^{2+}
PLC-PI- β Dominio PH	Fosfatidilcolina $K_d = 28 \mu\text{M}$
PLC-PI- γ 1 Dominio PH	PtdIns(3,4,5) P_3
Dominios SH2 en la región del "linker"	PtdIns(3,4,5) P_3 $K_d = 2.4 \mu\text{M}$

¹= sustrato

los residuos de la cresta hidrofóbica por alaninas, producen enzimas hasta tres veces más activas. Esto sugiere que más que facilitar la catálisis, la penetración de la cresta hidrofóbica en la membrana es un mecanismo de control que inhibe a la enzima (2).

El "linker"

El "linker" en la estructura cristalográfica de la PLC-PI- δ es una región desordenada que se localiza entre la β 4 y la α 4 (Fig. 2D). Esta secuencia comprende 46 residuos en la PLC-PI- δ 1 y posee un alto número de residuos con carga negativa, la proteólisis de esta zona inactiva a la enzima. Es probable que algunas moléculas como la esfingosina o la espermina regulen la actividad de la enzima a través de esta región (2).

El "linker" en las PLC-PI- γ es una estructura muy compleja si la comparamos con la misma región en las PLC-PI- δ y PLC-PI- β ; de hecho, es la característica que distingue a esta clase de PLC-PI- γ de las demás, (Fig. 1C). El "linker" en las PLC-PI- γ comprende dos dominios SH2 y uno SH3 insertados en lo que parece ser un segundo dominio PH, todo este arreglo multidominio se ubica entre las regiones X y Y.

Estos motivos adicionales SH2 y SH3 permiten que la PLC-PI- γ establezca interacciones proteína-proteína. La fosforilación de los residuos de tirosinas de la PLC-PI- γ 1 es mediada por tirosil cinasas y se da como respuesta a casi todos los factores de crecimiento. Su efecto es la activación de la enzima, aumentando la síntesis de Ins(1,4,5) P_3 y la movilización de Ca^{2+} . Tres residuos de tirosinas son fosforilados: la tirosina 783 que es esencial en la formación de Ins(1,4,5) P_3 , la tirosina 771 que no es indispensable y la tirosina 1254 que es necesaria para alcanzar la máxima producción de Ins(1,4,5) P_3 (3).

Para que las cinasas de residuos de tirosina dependientes de receptor puedan fosforilar a la PLC-PI- γ 1, debe de formarse un complejo entre la PLC-PI- γ 1 y el receptor, que es mediado por el reconocimiento por parte de la PLC-PI- γ 1 de una secuencia con fosfotirosina en el receptor a través del dominio SH2 (3). Los dos dominios SH2 de la PLC-PI- γ 1 son diferentes y pueden mediar el reconocimiento con diferentes sitios-receptores. Pero se ha observado que se requieren de ambos dominios SH2 para la asociación inducida por el receptor PDGF y la movilización de Ca^{2+} , lo mismo se ha visto para el recep-

tor EGF. La fosforilación de tirosinas tiene un papel predominante en la activación de PLC-PI- γ 1.

Recientemente se ha demostrado que los dominios SH2 pueden unir con alta afinidad a PtdIns(3,4,5) P_3 compitiendo con los receptores fosforilados en residuos de tirosina (Tabla I). La interacción de estos SH2 con PtdIns(3,4,5) P_3 podría actuar simultáneamente con la unión de PtdIns(3,4,5) P_3 por parte del dominio PH N-terminal, permitiendo la asociación con la membrana de la PLC-PI- γ o su permanencia en ella.

El motivo SH3 promueve la interacción con proteínas que contienen secuencias ricas en residuos de prolina, por lo que puede promover cascadas de señalización corriente abajo. Se ha demostrado *in vitro* que el dominio interactúa con dinamina e *in vivo* inhibe la partenogénesis inducida por c-kit en ratón (2).

La región del "linker" en la PLC-PI- γ regula la actividad de la enzima, funcionando como una tapa que bloquea o cierra el sitio activo en ausencia de eventos activadores. El control de esta tapa se da por fosforilación de residuos de tirosinas y por asociación con otras proteínas, o ambos, a través de los motivos SH2 o SH3, donde cualquiera de esos dos eventos altera la relación de la tapa con el sitio activo (3).

El dominio C2

Estructuralmente, el dominio C2 de la PLC-PI-d es un "sandwich" de ocho cadenas antiparalelas (Fig. 2C). Hay una alta similitud de secuencia en la familia de PLC-PI, lo que indica que este dominio está presente en todas las isoenzimas. Es similar al segundo dominio de la proteína cinasa C y se le conoce como dominio C2. Se ha determinado su estructura en la sinaptotagmina, la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA2), la proteína cinasa C- β (PKC- β) y proteína cinasa C- δ (PKC- δ), y a pesar de su similitud tridimensional, los dominios C2 tienen dos topologías diferentes que derivan de una conexión alterna entre los elementos de su estructura secundaria. La topología del dominio C2 de la PLC-PI- δ 1 es idéntica a la de la cPLA2 y PKC- δ . Muchos dominios C2 funcionan como módulos de unión a membrana dependientes de Ca^{2+} . El dominio C2 de la PLC-PI- δ 1 muestra tres sitios de unión a metales, con una alta conservación de los residuos de unión a Ca^{2+} . Por este motivo se cree que está involucrado en la unión a membrana. Sin embargo, se ha demostrado que la eliminación de los resi-

duos de unión a Ca^{2+} y su substitución por secuencias cortas de poliglicina, no altera la actividad catalítica de la enzima ni la dependencia de Ca^{2+} de su actividad. Aún falta demostrar si este dominio puede tener o no otra función *in vivo*. Podría tratarse de un remanente estructural cuya función ancestral fue la unión a membrana y que ahora sólo tiene un papel estructural estabilizando la estructura de la enzima (2). Tiene un papel central en las interacciones interdominio del núcleo catalítico. Aunque se sitúa en el extremo C-terminal, forma un puente entre el dominio EF y el dominio catalítico estabilizando a toda la enzima (8).

Se han identificado diferentes ligandos para el dominio C2, incluyendo fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol. Ambas interacciones son dependientes de Ca^{2+} (Tabla I). Los tres sitios de unión a Ca^{2+} en el dominio C2 de la PLC-PI- δ 1 se localizan en uno de los extremos del dominio C2 entre tres asas, las que conectan las cadenas β 1 con β 2, β 3 con β 4 y la β 5 con la β 6. Las asas de unión a Ca^{2+} (CBR's) se encuentran del mismo lado del sitio de unión a los substratos, en una posición propia para la unión dependiente de Ca^{2+} del grupo funcional del fosfolípido, (Fig. 2C). Es posible que en la PLC-PI- δ 1 la unión a membrana sea dirigida principalmente por el dominio PH, pero en las plantas que no poseen dominio PH, el dominio C2 debe ser el principal dominio de unión a membrana (8).

Las PLC-PI pueden asociarse reversiblemente con la membrana. Se han determinado distintos sitios para la interacción con la membrana, además del dominio catalítico. Con base en esto se ha propuesto un mecanismo de catálisis en tres etapas: 1) El primer evento es el anclaje de la enzima a la membrana, dirigido principalmente por el dominio PH; 2) la orientación en posición correcta de la enzima, con la superficie de la membrana para acceder al substrato, es un papel asociado al dominio C2 y 3) La catálisis de ciclos múltiples de hidrólisis de substrato, realizada por el dominio catalítico (8).

ACTIVACIÓN DE LA PLC-PI- γ POR RECEPTOR EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE Células B. Hasta este punto sabemos que las PLC-PI son enzimas que se encargan de la síntesis de dos segundos mensajeros importantes para la célula, el Ins(1,4,5) P_3 y el DAG, por hidrólisis de PtdIns(4,5) P_2 al asociarse a la membrana plasmática. Sabemos

también cómo es la estructura y el arreglo tridimensional en dominios de esta familia de enzimas; cómo se regula su actividad y en qué procesos participan. Sin embargo, aún nos hace falta ubicar a las PLC-PI dentro de la cascada de señales bajo la cual se regula su actividad, esto es, bajo qué señales externas se desencadena la activación de la enzima y cuáles son los procesos que se activan una vez producidos los segundos mensajeros. En ese sentido, ejemplificaremos la regulación de la PLC-PI- γ en las células B del sistema inmunitario, desencadenada a través de la oligomerización del receptor B. Este receptor es una proteína de membrana, que posee dominios citosólicos carentes de una función catalítica específica. El receptor se activa de la siguiente forma: la unión del ligando al receptor induce su oligomerización, lo que a su vez es la señal que permite el reclutamiento y activación de cinasas de residuos de tirosina citosólicas. Estas cinasas en su forma activa fosforilan a su vez a diferentes proteínas blanco, transduciendo así la señal.

La forma oligomérica del receptor B, que es capaz de desencadenar diferentes procesos, consiste en la asociación de un par de proteínas accesorias con la proteína mIgM. Estas proteínas accesorias son: Ig- α e Ig- β (también conocidas como CD79a y CD79b, codificadas respectivamente en los genes *mb-1* y *B29*), ambas son proteínas transmembranales que existen como heterodímeros, es decir, pares de Ig- α e Ig- β unidos por puentes disulfuro que se asocian de manera no covalente con la proteína mIgM conformando el complejo BCR (Fig. 3). Las proteínas CD79a y CD79b tienen una extensa región citoplasmática que es susceptible a la fosforilación de sus residuos de tirosina. Esta región comprende una secuencia base YXXL ([D/E][X]₇[D/E]XXYXX[L/I][X]_{6,8}YXX[L/I]) donde X puede ser cualquier residuo. Esta región es un elemento crítico en estas proteínas y se conoce como motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM). Estos ITAMs proveen al complejo: receptor-antígeno, de un sitio de unión específico para cinasas de proteínas en residuos de tirosina (PTK) asociadas a receptor (1).

La agregación u oligomerización del receptor B se desencadena por la asociación a antígenos multivalentes que inducen la fosforilación de las ITAM por cinasas de residuos de tirosina de la familia Src (Lyn, Fyn, Blk y/o Lck). La fosforilación de las tirosinas en el motivo de las ITAM genera un sitio de unión espe-

cífico para los dominios SH2 en tandem de la cinasa Syk, una cinasa de residuos de tirosina citosólica que contiene regiones consenso para los dominios homólogos de regiones Src (SH2). Esta cinasa de residuos de tirosina se activa por translocación a la membrana, cuando reconoce los residuos de tirosina fosforilados en los ITAMs del complejo BCR. Este proceso es un punto central en la activación de varias vías de señales corriente abajo e incluye, fosforilación, reclutamiento de proteínas a membrana, activación de interruptores-GTP moleculares, generación de segundos mensajeros y transcripción de genes (1).

Una de las proteínas que en la especie humana es fosforilada rápidamente cuando se estimula el receptor B, es la proteína BLNK, cuyo nombre en inglés significa proteína de enlace de la célula B; en ratón se le conoce como proteína leucocítica de 65 kDa con dominio SH2 (SLP-65); y en pollo como adaptador de la célula B que posee un dominio SH2 (BASH). La fosforilación en residuos de tirosina de BLNK es mediada por Syk, y se consigue solo cuando Syk está activada. La fosforilación de BLNK se detecta después de la fosforilación de los ITAM. De los 13 residuos de tirosina de BLNK, seis se encuentran en secuencias YXXP, las que pueden funcionar como sitios de reconocimiento a dominios SH2 de proteínas como la PLC-PI- γ , Nck y Vav. Nck pertenece a una clase de moléculas de señales llamadas adaptadores, y como Grb2, está compuesta sólo de dominios SH2 y SH3 y carece de actividad catalítica intrínseca. Vav, es el producto del proto-oncogen p95 y sólo se expresa en células de origen hematopoyético, funciona como un factor de intercambio de nucleótidos (GEF) que induce el intercambio de GDP por GTP en miembros de la familia de las GTPasas Rho: Rac-1, RhoA y Cdc42. Estas GTPasas actúan como interruptores moleculares que encienden cascadas de señales corriente abajo, estimulando enzimas como la fosfatidil inositol-4-fosfato-5-cinasa, la cinasa p21 y dos proteínas cinasas dependientes de mitógeno llamadas "cinasa amino terminal c-Jun" (JNK) y "p38". La estimulación de la familia de GTPasas Rho parece regular la polimerización del citoesqueleto de actina, que es esencial para una óptima movilización de Ca²⁺. La estimulación de BCR induce la asociación de esas tres proteínas con BLNK, demostrándose que tiene los atributos de proteína adaptadora similar a los dos adaptadores descritos en las células T: SLP-76 y LAT (1).

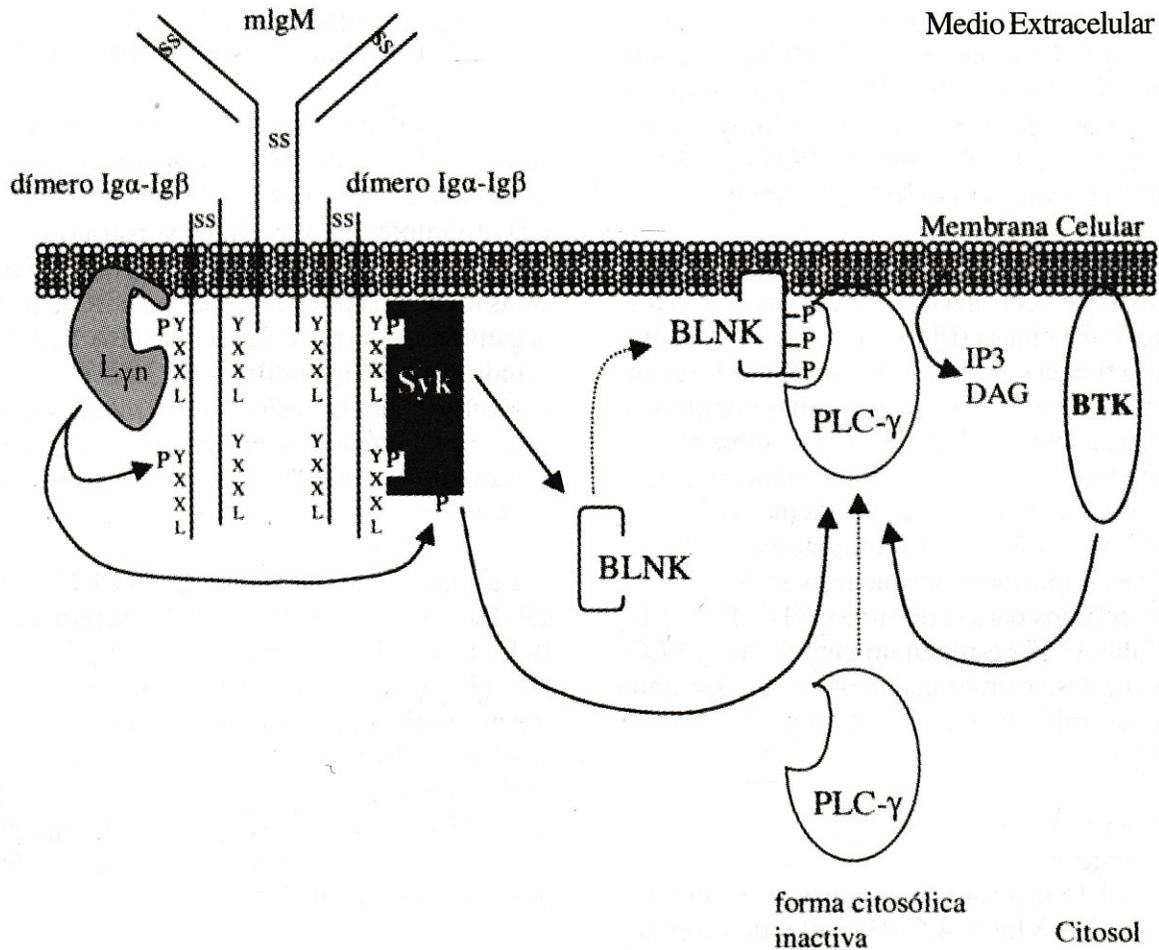


Figura 3. Esquema del mecanismo de activación de la PLC-PI- γ en las células B. Podemos indicar las siguientes etapas para alcanzar una máxima activación: 1) Agregación del receptor B: asociación no covalente de un par de dímeros accesorios a la proteína mIgM. Estas proteínas transmembranales accesorias existen como heterodímeros (pares de Ig- α y Ig- β unidos por puentes disulfuro). Se señala al Ins(1,4,5) P_3 como IP3. 2) La cinasa de residuos de tirosina Lyn, actúa en la región de las ITAM en cada uno de los dímeros accesorios (Ig α -Ig β), se indica el fosfato con una P. De esta forma se generan sitios de unión específicos para la cinasa de residuos de tirosina Syk. Syk se activa por translocación del citosol a la membrana y por fosforilación catalizada por Lyn. 3) Syk fosforila a su vez a la proteína BLNK, activándola. Así se generan sitios de reconocimiento para los dominios SH2 de proteínas tales como: PLC-PI- γ , Nck y Vav. 4) Translocación del citosol a la membrana de la PLC-PI- γ asociada a BLNK. PLC-PI- γ alcanza a su sustrato, y puede ser activada por fosforilación por la proteína cinasa de residuos de tirosina Syk. Se señala al Ins(1,4,5) P_3 como IP3. 5) La PLC-PI- γ alcanza su máxima activación al ser fosforilada por la proteína cinasa de residuos de tirosina Btk.

Tanto en humano como en ratón BLNK se expresa en todas las etapas del desarrollo de las células B (de pre-B a células plasmáticas). Esta proteína es muy similar estructuralmente con la proteína adaptadora SLP-76 de las células T. Ambas tienen un solo dominio SH2, una región ácida, una región básica y una región rica en residuos de prolina (1).

BLNK funciona como un adaptador central que enfoca (o centra) la señal a los efectores en la membrana plasmática para que sean fosforilados por Syk. Este adaptador fosforilado se transloca del citosol a la membrana plasmática en las células B activadas (1).

El reclutamiento de PLC-PI- γ por BLNK es un evento esencial para la activación de la enzima por fosforilación de sus tirosinas y para aproximarla directamente a su sustrato PtdIns(4,5) P_2 para síntesis de Ins(1,4,5) P_3 y DAG. Esto ha sido demostrado en células DT40 B en las que al suprimir el gen para BLNK, no se detecta fosforilación de PLC-PI- γ (1).

Para la completa activación de PLC-PI- γ además de la participación de Syk se requiere de otra proteína cinasa de residuos de tirosina, la tirosil cinasa de Bruton (Btk). Btk es activada por fosforilación del residuo de tirosina 551 por una cinasa de la familia

Src y en el residuo de tirosina 223 por autofosforilación. Btk y Syk participan en la fosforilación y activación de PLC-PI- γ 1 y PLC-PI- γ 2. La eliminación de Syk o Btk en células B elimina virtualmente la producción de $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ desencadenada por BCR, señalando la importancia de su acción simultánea (1).

En la activación de PLC-PI- γ en células B existe otra enzima que tiene una función importante: la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K). Esta enzima es rápidamente activada en paralelo con la PLC-PI- γ cuando se activa el complejo BCR. Ambas enzimas se traslocan a la membrana donde actúan sobre el mismo sustrato, $\text{PtdIns}(4,5)P_2$. PI3K adiciona de forma específica un fosfato al anillo de inositol, generando $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$. La acumulación de $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ es importante porque provee de sitios de unión específicos para el dominio PH de PLC-PI- γ y Btk, (Tabla I). El co-reclutamiento de Btk y PLC-PI- γ a la interfase membranal permite que Btk actúe de forma coordinada con Syk en la activación de PLC-PI- γ (1).

La activación de PLC-PI- γ en las células B promueve la síntesis de sus dos productos, el $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ y el DAG. El $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ se une a los receptores del tipo -1, -2 y -3 $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ en el retículo endoplásmico para liberar Ca^{2+} intracelular. Concentraciones elevadas de Ca^{2+} citosólico desencadenan la desfosforilación del factor NF-AT (factor nuclear de células T activadas) proceso mediado por la enzima calcineurina fosfatasa, lo que promueve la activación de eventos transcripcionales. Los niveles elevados de Ca^{2+} también promueven que los factores NF- κ B, c-Rel y Rel-A sean transportados al núcleo donde regulan el proceso de transcripción (1). El DAG activa ciertas isoformas de proteínas cinasas C (PKC) en la membrana plasmática (1).

Es importante señalar la compleja regulación por retroalimentación en las señales de BCR para la proteína Lyn. Lyn contribuye como un efector positivo para una óptima activación de Syk. Pero al mismo tiempo es capaz de iniciar procesos de regulación negativa por retroalimentación. Esto lo consigue por fosforilación directa de residuos de tirosina de los co-receptores inhibidores $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}1$ y CD22. La colocalización de los co-receptores $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}1$ y CD22 suprime las señales de BCR por reclutamiento de SHIP (dominio SH2 de la inositol polifosfato 5-

fosfatasa) y SHP-1 (dominio SH2 de la proteína fosfatasa de residuos de tirosina [PTP]-1) (1).

Syk es sustrato de SHP-1, SLP-76 también es sustrato directo de SHP-1, lo que sugiere que en las células B SLP-65 puede ser sustrato de SHP-1. CD72 también se supone es sustrato de SHP-1. SHP-1 puede, por tanto, desfosforilar varias moléculas involucradas en las señales de BCR, regulando negativamente la actividad celular (10). SHIP cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato que se requiere para la traslocación a membrana de proteínas con dominio PH. Esto inhibe la activación de la cinasa Akt (o proteína cinasa B) y Btk (que participa en la respuesta al Ca^{2+}) (10).

Células T. La regulación de las PLC-PI- γ en las células T es muy similar a la descrita para las células B. En las células T, la expresión de IL-2 requiere de NF-AT y de otros activadores transcripcionales que son necesarios para la expansión clonal de las células activadas por antígeno. En este caso, la movilización de Ca^{2+} activa a la calcineurina fosfatasa la que desfosforila y activa a NF-AT. Aquí la PLC-PI- γ participa en la expresión génica y en los mecanismos de proliferación celular (3).

Durante la activación de las células T participan tres familias diferentes de cinasas citosólicas de residuos de tirosina en la fosforilación de PLC-PI- γ (3). Se requieren, indirectamente, miembros de la familia Src para la fosforilación de residuos específicos de tirosina en los motivos de activación del inmunoreceptor basados en residuos de tirosina (ITAM), presentes en el dominio citoplásmico del receptor celular T. Los ITAM fosforilados sirven como sitios de unión para cinasas de residuos de tirosina de la familia ZAP-70 (similar a la proteína cinasa de residuos de tirosina Syk), enzimas que poseen dominios SH2. Cuando Zap-70 se asocia a las ITAM se fosforila específicamente en residuos de tirosina, mecanismo por el cual se activa. Estas cinasas son entonces capaces de formar complejos con los dominios SH2 de la PLC-PI- γ 1 y son, probablemente, las cinasas que fosforilan directamente a la PLC-PI- γ 1 en las células T. Sin embargo, las cinasas de la familia Tec, Itk y Rli son necesarias para la fosforilación máxima de PLC-PI- γ 1. La familia de las cinasas de residuos de tirosina ZAP-70 se asocian a la membrana a través de un dominio SH2 que reconoce receptores

polipeptídicos fosforilados en residuos de tirosina. Itk tiene un dominio PH que le permite su unión a la membrana, Rlk está palmitoilado (3).

En la activación de PLC-PI- γ 1 en células T, también participan proteínas adaptadoras similares a la proteína BLNK. En este caso, se trata de dos proteínas adaptadoras: LAT y SLP-76. LAT es una proteína integral de membrana de 36-38 kDa que es fosforilada durante la activación de las células T. Esta proteína normalmente está palmitoilada, lo que la localiza en los microdominios de la membrana enriquecidos en colesterol (3). Se piensa que ZAP-70 fosforila a LAT, la cual una vez fosforilada se asocia con proteínas transmisoras de señales que contienen dominios SH2. Se ha propuesto que la PLC-PI- γ 1 usa sus dos dominios SH2 para asociarse con ZAP-70 y LAT simultáneamente, para maximizar la fosforilación y su localización en membrana.

En células T activadas, el adaptador citoplasmático SLP-76 se fosforila en residuos de tirosinas (por la cinasa ZAP-70), lo que le permite asociarse a PLC-PI- γ 1. SLP-76 tiene una región central rica en residuos de prolina que puede asociarse a dominios SH3, un dominio SH2 C-terminal con el que reconoce proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y sitios de fosforilación en residuos de tirosina en el extremo N-terminal, con el que puede asociarse a dominios SH2 (3).

Este complicado esquema de activación que hemos descrito para la PLC-PI- γ en células B y células T revela el riguroso control al que está sometida esta familia de isoenzimas para el control de eventos tan importantes como la proliferación celular y la respuesta inflamatoria. El arreglo estructural en dominios es otro indicativo del papel que juegan estas enzimas en la producción de segundos mensajeros en respuesta a estímulos externos, lo que lleva a la liberación de Ca^{2+} intracelular y a la activación de diferentes enzimas clave.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Mario L. Calcagno y a Laura I. Alvarez A. por la revisión crítica de este artículo. GMM y SLG agradecen las becas recibidas por parte de CONACYT, PAPIIT y los recursos recibidos del programa PAEP. SLG agradece el apoyo recibido por parte del programa de Doctorado Cien-

cias Bioquímicas de la Facultad de Química para realizar una estancia de investigación en el Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council, Cambridge, UK.

REFERENCIAS

1. Campbell K S (1999) Signal transduction from the B cell antigen-receptor. *Curr Opin Immunol* 11: 256-64.
2. Williams R L (1999) Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim Biophys Acta* 1441: 255-267.
3. Graham C y Qun-sheng J (1999) Phospholipase C gamma as a signal-transducing element *Exp Cell Res* 253: 15-24.
4. Wu D, LaRosa G J y Simon M I (1993) G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science* 261: 101-3.
5. Dibirdik I, Kristupaitis D, Kurosaki T, Tuel-Ahlgren L, Chu A, Pond D, Tuong D, Luben R y Uckun F M (1998) Stimulation of Src family protein-tyrosine kinases as a proximal and mandatory step for SYK kinase-dependent phospholipase Cgamma2 activation in lymphoma B cells exposed to low energy electromagnetic fields. *J Biol Chem* 273: 4035-9.
6. Ferguson K M, Lemmon M A, Schlessinger J y Sigler P B (1995) Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 83: 1037-1046.
7. Essen L O, Perisic O, Cheung R, Katan M y Williams R L (1996) Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* 380: 595-602.
8. Williams R L y Katan M (1996) Structural views of phosphoinositide-specific phospholipase C: signalling the way ahead. *Structure* 4: 1387-94.
9. Paterson H F, Savopoulos J W, Perisic O, Cheung R, Ellis M V, Williams R L y Katan M (1995) Phospholipase C delta 1 requires a pleckstrin homology domain for interaction with the plasma membrane. *Biochem J* 312: 661-666.
10. Tsubata T (1999) Co-receptors on B lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 11: 249-55.
11. Kraulis P J (1991) MOLSCRIPT: A Program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Crystallogr* 24: 946-950.
12. Merrit E A y Bacon D J (1997) Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics. *Meth Enzymol* 277: 505-524.

GENERALIDADES SOBRE LA BIOQUÍMICA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS

Edmundo M. Rodríguez Campos y Alberto Hamabata. Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Apartado Postal 14-740, C. P. 07000, México, D.F. Tel.: 5747-7000, Ext. 5237, 5216. Fax: 5747-7083. Correo electrónico: ahamabat@mail.cinvestav.mx

Recibido: 14 de noviembre de 2000. Aceptado: 22 de mayo de 2001.

RESUMEN

Hay una evidencia creciente sobre el papel que juegan los radicales libres en los daños celulares que los diferentes tipos de estrés provocan. En este artículo se revisan las fuentes de especies reactivas de oxígeno, los compartimientos celulares donde éstos se originan, los daños que ocasionan a las principales macromoléculas y los sistemas bioquímicos para la defensa contra estos compuestos. En donde es posible, se hace énfasis en los sistemas vegetales. Finalmente, se propone el desarrollo de nuevas tecnologías agrícolas para incrementar el rendimiento de las cosechas mediante el uso de los antioxidantes naturales presentes en las plantas silvestres.

ABSTRACT

The evidence upon the role of the reactive species of oxygen on the cellular damage for abiotic stresses is increasing. Here, there is a short review of the sources of oxygen free radicals, the damage that they do upon the principal macro-molecules and the biochemical systems developed in evolution course, to avoid the reactive oxygen species formation and propagation with emphasis in the plant systems. It is proposed the development of new technologies to increase plant production by means of natural antioxidants from wild plants.

INTRODUCCIÓN

“El oxígeno es vida” es una verdad de Perogrullo; quien lo dude, deje de respirar por unos minutos. Sin embargo, vemos en las estanterías de las farmacias y tiendas de nutrición con mayor frecuencia productos a base de “antioxidantes”. Pareciera que aunque la base energética de nuestra vida es un conjunto de oxidaciones, éstas de alguna manera se vuelven en contra nuestra y resulta necesario desarrollar medicamentos que nos protejan de esas reacciones.

Recientemente se ha encontrado que muchas enfermedades degenerativas, o propias de personas de

edad avanzada, están relacionadas con desórdenes de tipo oxidativo, es decir con oxidaciones que dañan la funcionalidad de moléculas importantes; para citar sólo unos ejemplos: arterioesclerosis, diabetes, fibrosis cística, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, cáncer y envejecimiento (1). Existen evidencias de una correlación entre estas enfermedades y un aumento en los niveles de sustancias oxidantes del tipo denominado “especies reactivas del oxígeno”, que son diferentes estados de reducción de la molécula de oxígeno y que provocan en las células una serie de daños asociados a oxidaciones de moléculas importantes.

En las plantas sucede algo similar. Dado su carácter sésil, las plantas normalmente sufren de períodos de altos niveles de luz, sombra, temperaturas altas y bajas, sequía, anegamiento, alta salinidad, desbalance de nutrientes, infecciones, depredación, compuestos tóxicos naturales y sintéticos, todos los cuales pueden ser estresantes si persisten. Diferentes tipos de estrés producen en las plantas, entre otros efectos, alteraciones estructurales y funcionales en sus sistemas membranales. Hay una creciente evidencia de que en este daño las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) juegan un papel en las reacciones que preceden a la pérdida de la integridad membranal. Podemos generalizar diciendo que los daños fisiológicos provocados en las plantas por diferentes tipos de estrés están mediados, por lo menos en parte, por un estrés oxidativo al nivel celular (2).

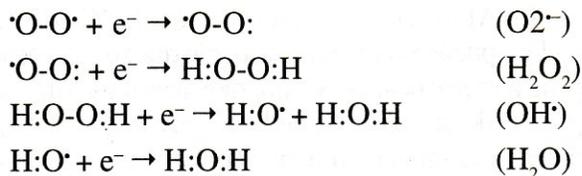
En este escrito intentaremos describir cómo un proceso químico vital, como lo es la oxidación, puede resultar también ser un enemigo de los procesos vitales. Se describirán, de una manera muy resumida y haciendo énfasis en lo que ocurre en las plantas, estas oxidaciones dañinas, las sustancias químicas que las ocasionan, su origen, algunos de los procesos bioquímicos de protección contra estas sustancias y

finalmente, se propone el uso de antioxidantes en la práctica fisiotécnica de los cultivos, como sustancias capaces de producir efectos fisiológicos similares a los promotores del crecimiento.

LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) COMO OXIDANTES CELULARES

Las cargas eléctricas que giran generan campos magnéticos. Esto es válido tanto para la corriente eléctrica en la bobina de un motor como para un simple electrón. El apareamiento de los electrones con un estado de spin (giro) contrario neutraliza este efecto. La mayor parte de las sustancias no interactúan con campos magnéticos porque todos sus electrones se encuentran formando pares con spines opuestos; sin embargo el oxígeno si es influenciado por los campos magnéticos, —se dice por esto que es una sustancia “paramagnética”— porque tiene dos electrones no apareados con el mismo spin. La presencia de electrones no apareados es también la explicación a la poca reactividad hacia moléculas orgánicas, pues éstas tienen sus electrones de valencia en pares de spines opuestos.

Sin embargo, si se resuelve la limitación que imponen los electrones del mismo spin, el oxígeno puede reaccionar fuertemente con moléculas orgánicas; esto puede ocurrir mediante dos mecanismos, uno de ellos implica la absorción de suficiente energía para revertir el spin de uno de los electrones, lo cual generalmente sucede mediante la transferencia de un excitón desde un aceptor de fotones; este mecanismo está presente en los cloroplastos. La molécula de oxígeno resultante es conocida como singulete ($O-O\cdot$), el cual reacciona fácil y rápidamente con moléculas orgánicas. El otro mecanismo para la activación del oxígeno consiste en reducciones monovalentes (transferencia de un solo electrón) que se dan en reacciones secuenciales, tales como:



Un electrón se transfiere a la molécula de oxígeno en su estado basal, en el cual es un bi-radical (y se genera el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); mediante un segundo electrón y protones, el ión superóxido se reduce a peróxido de hidrógeno (H_2O_2); la reducción

monovalente del peróxido produce una molécula de agua y al radical hidroxilo ($OH\cdot$); finalmente, la adición de otro electrón al radical, rinde otra molécula de agua. La primera reducción, que produce al $O_2^{\cdot-}$ es endotérmica, con un cambio de energía libre de 7.6 kcal/mol, el resto de las reducciones son exotérmicas y la reacción global de la reducción del oxígeno hasta agua tiene un $\Delta E = -76.6$ kcal/mol (3).

El ión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo pueden tener otras reacciones que producen radicales peroxilo; todas estas moléculas son, por sí mismas o en presencia de metales de transición, altamente oxidantes y son las mencionadas anteriormente como especies reactivas de oxígeno (ROS). A excepción del H_2O_2 , todas ellas son radicales libres, que se caracterizan por tener un electrón de valencia no apareado, lo que les confiere su alta reactividad y su capacidad para participar en reacciones en cadena, éstas son auto-sostenidas ya que los productos de un paso inician el paso subsecuente, por ejemplo, supongamos cualquier compuesto orgánico reducido: $RH + \cdot OH \rightarrow R\cdot + H_2O$; $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$; $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$; $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$, etc.

Estas reacciones en cadena explican cómo los radicales libres, aún a una concentración inicial muy baja, pueden causar daños muy grandes.

LAS “ROS” SE GENERAN EN DIFERENTES COMPARTIMIENTOS CELULARES

Las especies reactivas de oxígeno aparecen en prácticamente cualquier sitio de la célula, sin embargo, en las plantas, el cloroplasto parece ser el orgánulo de máxima producción (4):

La reducción monovalente del oxígeno puede ocurrir en el lado reductor del fotosistema I, si no existe suficiente NADP⁺. Esto sucede cuando las reacciones del ciclo de Calvin no oxidan al NADPH a la misma velocidad a la que se produce. Se considera que éste es el principal mecanismo que genera ROS en las plantas.

En la fotorrespiración, la adición de oxígeno al carbono 2 de la ribulosa-bis-fosfato genera una molécula de fosfoglicerato y una de fosfoglicolato. Aunque esta actividad oxigenasa de la Rubisco no produce ROS directamente, la oxidación del glicolato a glioxilato en los peroxisomas genera peróxido de hidrógeno.

La clorofila foto-activada normalmente transfiere su energía de excitación a los centros de reacción de los fotosistemas. Sin embargo, en condiciones en las cuales esta energía capturada no puede ser eficientemente utilizada, la energía se disipa parcialmente mediante su transferencia al oxígeno, permitiendo la transición de triplete a singulete (la inversión del spin de uno de los electrones no apareados, que se mencionó en párrafos anteriores, $^1\text{O}-\text{O}^* \rightarrow ^3\text{O}-\text{O}$). Las condiciones en las cuales la clorofila no transfiere su energía eficientemente incluyen: cierre de estomas causado por sequía, daño en los sistemas de transporte membranales, falta de nutrientes específicos (potasio, magnesio, manganeso, zinc o hierro), taponamiento de los tubos cribosos por infecciones y envenenamiento por contaminantes y herbicidas.

En las mitocondrias las diferentes especies de ROS derivan de la formación del ión superóxido mediante la reducción monovalente del oxígeno por componentes de la cadena de transporte de electrones, principalmente a partir de la ubisemiquinona (QH1) y por la NADH deshidrogenasa. El aumento de ROS en las mitocondrias de células animales, y posiblemente de células vegetales, se ha asociado con los fenómenos de envejecimiento y menor esperanza de vida (5).

En el retículo endoplásmico suceden algunas reacciones biosintéticas claves, catalizadas por oxigenasas, del tipo del citocromo P450, como la cinamato-4-hidroxilasa que participa en la síntesis de flavonoides y de la lignina o como las oxigenasas de la síntesis de giberelinas. La reacción típica es $\text{RH} + \text{NADPH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROH} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$. En esta reacción un paso indispensable es la activación del oxígeno, después de la reducción univalente del sustrato y de la adición de oxígeno, se forma el complejo P450-RHOO que eventualmente puede descomponerse en P450-RH y liberar superóxido.

En las fracciones de la membrana plasmática se ha encontrado actividad de una NAD(P)H oxidasa que genera superóxido. La enzima es una flavoproteína que produce este radical por oxidación de ciertas quinonas y compuestos nitrogenados.

En las paredes celulares la lignina se sintetiza por el entrecruzamiento de los precursores fenilpropanoides mediante reacciones dependientes de H_2O_2 , enton-

ces las ROS son fundamentales en la biosíntesis de este polímero. El peróxido se forma por la actividad de la enzima NADH oxidasa, el cofactor oxidado NAD es reducido por una malato deshidrogenasa de la pared celular.

LOS DAÑOS DE LOS RADICALES LIBRES EN LAS CÉLULAS

Las células tienen que ajustarse a la presencia principalmente de 3 tipos de ROS: el ion superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^*) y diferentes radicales peróxido.

Se conocen pocas reacciones en las cuales el superóxido (O_2^-) ocasione un daño directo a componentes de las células, su importancia es mayor como precursor de otros oxidantes más reactivos, como lo es en particular el radical hidroxilo. Recientemente se ha acumulado evidencia sobre su toxicidad *per se*: El O_2^- es capaz de destruir los grupos hierro-azufre: las enzimas que tienen regiones 2Fe-2S expuestos al solvente (como la aconitasa y otras hidrolasas) son inactivadas por el superóxido; esta reacción tiene además la consecuencia de liberar iones Fe^{+2} lo que favorece la formación del hidroxilo (6).

El peróxido de hidrógeno no es muy reactivo, pero en presencia de un metal reductor forma, mediante la reacción de Fenton, al radical hidroxilo: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^* + \text{OH}^-$. Para mantener esta reacción se requiere de una reducción que recicle el Fe^{3+} ; además de los agentes reductores normales de las células, el ión superóxido puede jugar ese papel, $^*\text{O}_2^- + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$.

El radical hidroxilo es el oxidante más fuerte que se conoce y reacciona con moléculas orgánicas a velocidades sólo limitadas por la difusión. Debido a esto, reacciona en la vecindad más inmediata a su sitio de formación, es decir, donde se encuentra el metal reductor. Debido a su carácter de polianión, el ADN es una macromolécula donde los iones Fe^{2+} pueden concentrarse, por lo que su oxidación es generalmente ocasionada por radicales hidroxilo, ésta implica la degradación de las bases, el rompimiento de la cadena y el entrecruzamiento con proteínas.

El ataque a las bases resulta en una adición de hidroxilo a los dobles enlaces ricos en electrones, particularmente en los enlaces N-7-C-8 de las purinas y en el enlace 5,6 de las pirimidinas. También ocu-

re una abstracción de hidrógeno de los grupos metil de la timina. En células de mamífero se conocen más de 50 diferentes alteraciones ocasionadas por ataques oxidativos a las bases nitrogenadas, entre cuyos productos se pueden mencionar a la 8-hidroxiguanidina, hidroximetil urea, urea, timina glicol y otros productos que implican la apertura y saturación del anillo de la timina y la adenina (7). El daño por el radical hidroxilo también puede ocurrir en los residuos de desoxirribosa, que se inicia por una abstracción de hidrógeno y finalmente ocasiona el rompimiento de la cadena y la liberación de una base. La mayor parte de los otros daños en el azúcar dan 5'- y 3'- fosfomonoésteres flanqueando un espacio de un nucleósido. Otra alteración es una inversión β a α del carbono 1'- que interrumpe la estructura secundaria del ADN. El radical hidroxilo provoca también el entrecruzamiento ADN-proteína mediante aductos timina-cisteína.

En las proteínas el ataque oxidativo resulta en modificaciones de los aminoácidos, fragmentaciones, agregación de productos entrecruzados, carga eléctrica alterada y mayor susceptibilidad a la proteólisis. La oxidación puede ocurrir tanto en la cadena peptídica, como en las cadenas laterales (8).

El ataque a la cadena peptídica se inicia cuando un radical hidroxilo abstrae un hidrógeno del carbono α de un residuo aminoácil para formar un radical centrado-en-carbono, que reacciona rápido con el O_2 y forma un radical alquilperoxil. Los siguientes pasos dan lugar secuencialmente, a un peróxido de alquilo, un radical alcoxilo y finalmente a un derivado hidroxilado de la proteína. Los intermediarios alquilo, alquilperoxilo y alcoxilo pueden reaccionar con otros aminoácidos de la misma o de otra molécula y generar otro radical centrado-en-carbono que continúa la oxidación. Dos de estos radicales pueden reaccionar entre sí y formar un entrecruzamiento proteína-proteína. La formación del radical alcoxilo permite el rompimiento de la cadena. Pero esto también puede ocurrir mediante el ataque oxidativo (abstracción de H por $\cdot OH$) del carbono γ del ácido glutámico, el aspártico o la prolina.

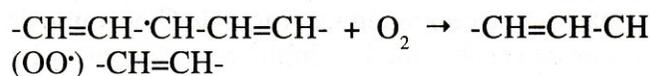
Todos los residuos son susceptibles de oxidación por el $\cdot OH$, pero no todos los productos oxidados están bien caracterizados. Los residuos que se oxidan más fácil son los de la cisteína y la metionina, la cisteína forma al oxidarse puentes disulfuro y la

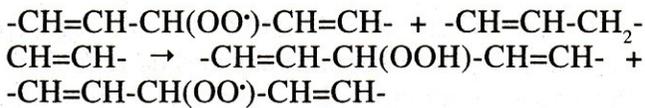
metionina un sulfóxido (MeSOX). Sin embargo, en las células existen enzimas capaces de reducir de nuevo a estos aminoácidos como son las disulfuro reductasas y las reductasas de sulfóxido de metionina. La presencia de residuos expuestos de estos aminoácidos pueden actuar, en combinación con estas enzimas, como atrapadores efectivos de radicales libres y proteger de esta manera del ataque oxidativo.

El óxido nítrico es un catabolito normal en la degradación de la arginina y reacciona con O_2^- para formar el peroxinitrito, que es un oxidante potente y puede fácilmente oxidar a la cisteína, metionina, tirosina y al triptofano. La capacidad para oxidar los residuos de tirosina puede ser muy importante en la regulación de algunos aspectos del metabolismo, puesto que los derivados así formados son incapaces de sufrir fosforilaciones o nucleotilaciones.

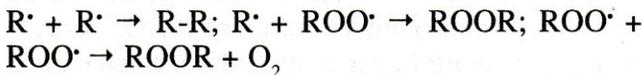
Por diferentes vías se forman derivados carbonilo de las proteínas: rompimiento de la cadena polipeptídica, por oxidación de lisina, arginina, prolina, triptofano y por reacciones con aldehídos que se producen en la peroxidación de lípidos (malón-dialdehído, 4-hidroxi-2-nonenal) o con derivados carbonilos que se forman con la reacción de azúcares reductores (o sus productos oxidados) con lisina. La presencia de grupos carbonilo de las proteínas es un indicador de la oxidación por ROS y se utiliza como un marcador de daño oxidativo.

La peroxidación de los ácidos grasos insaturados es una de las oxidaciones por radicales libres mejor conocidas; en ésta, se pueden ilustrar muy claramente las diferentes etapas de las reacciones en cadena (6): la reacción de iniciación consiste en la substracción de un hidrógeno del grupo metilvinil por el radical hidroxilo, el radical que resulta forma una estructura de resonancia con los dobles enlaces adyacentes: $-CH=CH-CH_2-\dot{C}H-CH=CH-$ \rightarrow $-\dot{C}H=CH-CH-CH=CH-$. En la reacción de propagación una molécula de oxígeno reacciona con el radical libre, para formar un radical peróxido, que a su vez abstrae un hidrógeno a una segunda molécula de lípido para producir el hidroperóxido y otro radical centrado en carbono en la segunda molécula:





El hidroperóxido en presencia de ion ferroso es inestable pues se reduce a $\text{RO}\cdot$ y $\text{OH}\cdot$. Entre los productos de la reacción hay aldehídos como el malón-dialdehído e hidrocarburos como el etano y el etileno. La reacción en cadena termina mediante el entrecruzamiento de dos radicales:



Mediante estas reacciones se forman ácidos grasos entrecruzados de alto peso molecular. Por otra parte, el oxígeno en singlete puede reaccionar con ácidos grasos insaturados produciendo una mezcla compleja de hidroperóxidos.

LAS DEFENSAS DE LAS CÉLULAS CONTRA LOS OXIDANTES

Los organismos han desarrollado sistemas para mantener bajos los niveles de oxígeno reactivo; básicamente, estos consisten en enzimas y metabolitos capaces de atrapar radicales libres o interrumpir su propagación en las reacciones en cadena. En las plantas, las enzimas cuya función directa es mantener bajos los niveles de radicales libres son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la ascorbato peroxidasa. Entre los metabolitos, los más ampliamente distribuidos son el ascorbato, el glutatión, el tocoferol y los carotenoides, los que son oxidados por los radicales libres sin generar reacciones en cadena (figura 1). Para casi todos estos compuestos existen sistemas enzimáticos capaces de reducir sus formas oxidadas y regenerar así la forma activa y coordinadamente actúan como atrapadores de radicales libres.

Superóxido dismutasa (sod)

Cataliza la dismutación del ión superóxido en oxígeno y H_2O_2 : $\cdot\text{O}_2^- + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$. Las SOD están presentes en diferentes compartimientos celulares, existen varios tipos que se distinguen por el metal que forma parte de su sitio alostérico: las Cu/Zn SOD son las más ampliamente distribuidas, están presentes en todas las células eucarióticas, son dímeros que contienen un átomo de Cinc y uno de Cu en cada subunidad, se inhiben con cianuro y las inactiva el H_2O_2 ; se han localizado en el cloroplasto,

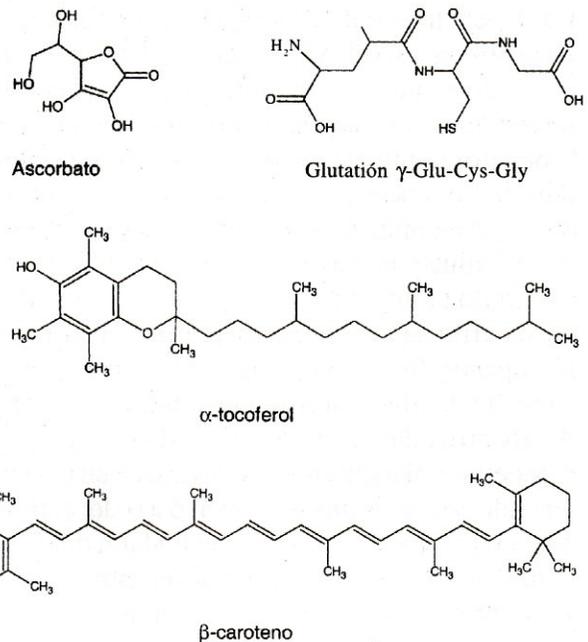


Figura 1. Las principales moléculas atrapadoras de radicales libres.

citosol y peroxisomas. Las MnSOD se encuentran únicamente en la mitocondria y son resistentes tanto a cianuro como al peróxido de hidrógeno. Las FeSOD son resistentes al cianuro pero inhibibles por el H_2O_2 , la proteína nativa contiene un péptido de tránsito que la marca como enzima del cloroplasto y de acuerdo a estudios comparativos, parecen de origen endosimbionte, a diferencia de la CuZnSOD de cloroplasto que parece haberse originado por una duplicación del gen de la célula hospedera. La FeSOD se ha encontrado sólo en algunas especies taxonómicamente distantes (9).

La actividad de SOD aumenta en respuesta a xenobióticos, sequía, anegamiento y exceso de luz.

Catalasa

Es una enzima que contiene un grupo hemo y cataliza la dismutación del H_2O_2 en agua y oxígeno. Se encuentra en todos los eucariotes aeróbicos, es importante en la remoción del H_2O_2 generado en los peroxisomas por enzimas involucradas en la β-oxidación de los ácidos grasos, en los glioxisomas en el ciclo del glioxalato y en el catabolismo de purinas. Es un tetrámero que puede alcanzar hasta 220 KDa. En el maíz se han aislado 3 isoformas que se expresan en diferentes compartimientos: peroxisoma, citosol y mitocondria. Diferentes tipos de estrés como son el salino y el choque térmico reducen los niveles de catalasa, lo que puede ser rele-

vante para la capacidad de la planta para sobrellevar esas condiciones (10).

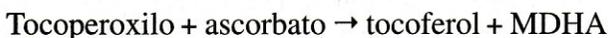
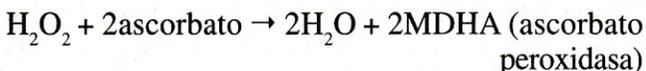
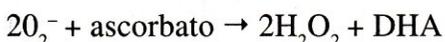
Aspartato peroxidasa (apx)

Cataliza la reducción de H_2O_2 a agua con una alta afinidad y especificidad por ascorbato como reductor. Su secuencia difiere de otras peroxidasa y hay diferentes isoformas en cloroplastos, citosol, mitocondrias, peroxisomas y glioxisomas. También hay unidas a membranas en peroxisomas y tilacoides.

A la reducción del oxígeno en el PSI acoplada con la remoción del H_2O_2 resultante por parte de la APx se le denomina la reacción de Mehler y contribuye a la regulación del estado redox de los acarreadores de electrones fotosintéticos, al drenar el exceso de electrones hacia el oxígeno molecular. En plantas de *Arabidopsis thaliana* adaptadas a baja intensidad de luz, que después se exponen a alta luz (HL), se incrementan rápidamente los transcritos de APX1 y APX2 que codifican para dos isoformas de APX citosólicas y su inducción está correlacionada con los niveles de reducción de la quinona B y la plastoquinona (igual que otros genes fotosintéticos). La H_2O_2 aumenta la expresión de APX e induce su expresión en tejidos no fotosintéticos, tal vez definiendo la respuesta sistémica a HL (11).

Ácido ascórbico

El ascorbato es un derivado oxidado de la galactosa y es el antioxidante predominante en las plantas. Se encuentra en todos los compartimientos celulares incluyendo al apoplasto, la concentración celular puede llegar a 25 mM y en el estroma de los cloroplastos es aún mayor. El ascorbato es capaz de reducir al oxígeno, al superóxido, oxígeno en singulete, al radical tocoferoxil (la forma oxidada del tocoferol) y al peróxido de hidrógeno. Reacciona más rápido que otros antioxidantes, la reacción con el radical hidroxilo se limita sólo por difusión:



La oxidación del ascorbato genera el radical monodehidroascorbato (MDHA), que se transformará en

dehidroascorbato (DHA) y ascorbato (11). El ascorbato se regenera mediante la MDHA reductasa que usa NAD(P)H y la DHA reductasa que usa glutatión reducido y lo transforma en oxidado: $2\text{GSH} + \text{DHA} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ascorbato}$.

Glutatión

Es el tripéptido $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$, en algunas leguminosas existe el homoglutatión que es $\gamma\text{-Glu-Cys-Ala}$. El glutatión reacciona directamente con oxígeno en singulete, el superóxido y con el radical hidroxilo, se oxida hasta el dímero GSSG vía el radical tiilo. Puede estabilizar membranas al reaccionar con los peróxidos de lípidos. Es capaz de regenerar al ascorbato aún sin enzimas si el pH es mayor que 7 y su concentración supera a 1 mM; estas dos condiciones ocurren en el estroma de los cloroplastos.

La glutatión reductasa cataliza la reducción del GSSG a GSH. En los animales sólo se ha descrito una forma, mientras que en las plantas existe como múltiples isoenzimas. En el chícharo, el análisis electroforético mostró 8 diferentes, que aparentemente se expresan en diferentes organelos (12); en los cloroplastos es donde se detecta mayor actividad de esta enzima, pero también hay actividad notoria en el citosol y en las mitocondrias.

Tocopherol (vitamina E)

Es una benzoquinona completamente sustituida que cuenta con una cadena lateral hidrocarbonada que le confiere un carácter anfipático. Estabiliza las membranas mediante el acomplejamiento con los ácidos grasos libres y atrapando al oxígeno en singulete y a los peróxidos de lípidos:



El radical tocoferoxil se estabiliza dentro del anillo de quinona, por lo que evita eficientemente la propagación de la reacción en cadena. El ascorbato reduce al tocoferoxil y regenera así la forma activa del tocoferol (13).

Carotenoides

Son isoprenoides de 40 carbonos y tetra-terpenos que actúan como pigmentos accesorios y como antioxidantes en los cloroplastos. Cuando los niveles de excitación de la clorofila exceden al sistema fotosintético pueden absorber el exceso de energía que se genera, absorben la energía de la clorofila en estado

de triplete y del oxígeno en singulete, disipándola como calor sin generar compuestos reactivos. Los carotenoides reaccionan también con peróxidos de lípidos y terminan de esta forma con las reacciones en cadena en la membrana (14).

LOS DIFERENTES ANTIOXIDANTES FORMAN UN SISTEMA MUY INTEGRADO

Estas defensas celulares contra las ROS son el resultado de una adaptación exquisita y son estrategias complementarias e interdependientes: los carotenoides compiten por el exceso de energía que se fuga de los fotosistemas e impiden la formación de especies reactivas del oxígeno; otros componentes en la membrana, como el tocoferol, terminan con las reacciones en cadena de la peroxidación de los lípidos; los componentes solubles, como el ascorbato y el glutatión detoxifican directamente a las ROS en solución y sir-

ven también para el reciclaje de los componentes protectores de las membranas.

Al ser el cloroplasto el principal sitio potencial en la generación de ROS, no es de extrañar que allí encontremos la máxima coordinación entre los diferentes sistemas antioxidantes. Como ya se mencionó, un exceso de poder reductor en el fotosistema I conduce a la formación del ión superóxido y al H_2O_2 , en condiciones normales éstos son rápidamente atrapados por un sistema de antioxidantes presentes en los tilacoides, tanto unidos a las membranas como solubles en el estroma; éstos incluyen a la CuZn superóxido dismutasa; a la ascorbato peroxidasa, al ascorbato y a la dehidroascorbato reductasa, entre otros. En este sistema (figura 2) el resultado global es la reducción de O_2 hasta agua y la regeneración de los diferentes antioxidantes mediante reacciones que utilizan

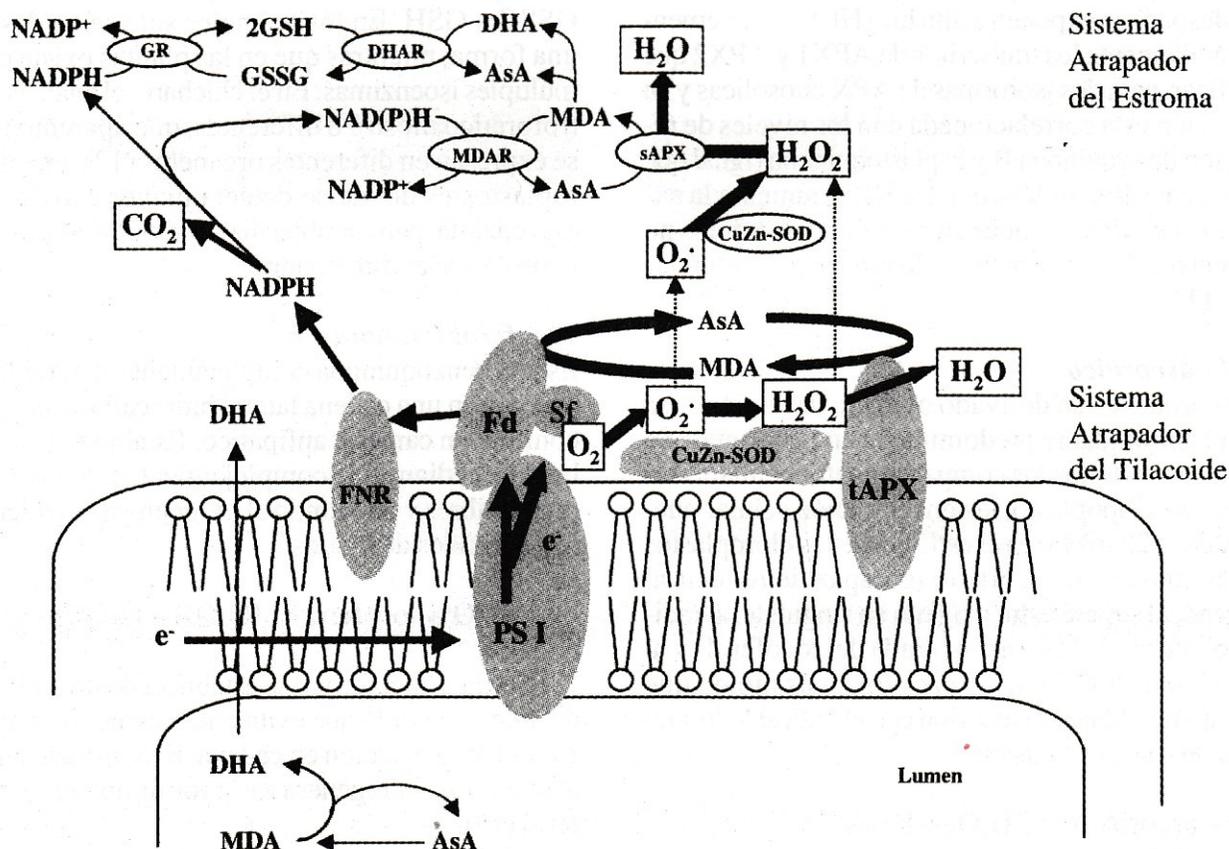


Figura 2. El atrapamiento de oxígeno activo y la disipación del exceso de fotones en el cloroplasto, mediante la reducción de la molécula de bioxígeno a agua en el ciclo agua-agua. El $O_2^{\cdot-}$ se produce directamente en el fotosistema I (PS). Hay dos sistemas para la disipación del superóxido, uno asociado a las membranas del tilacoide e involucra a la CuZn superóxido dismutasa y a la ascorbato peroxidasa (tAPX), el monodehidro ascorbato (MDA) resultante puede ser directamente reducido por la ferredoxina (F). Los componentes de otro sistema se encuentran solubles en el estroma, que incluyen además de la CuZnSOD y la APX del estroma a la monodehidro-ascorbato reductasa (MDAR) que utiliza NADPH como reductor y la dehidro-ascorbato reductasa (DHAR) que utiliza la glutatión como reductor. Tomado de Asada, 1999.

los electrones que provienen de la fotólisis del agua, por lo que Asada ha denominado a este conjunto de reacciones el Ciclo Agua-Agua (15).

Sin embargo en ciertas circunstancias pueden aún generarse radicales $\cdot\text{OH}$ por desorden de este ciclo ocasionado por diferentes condiciones estresantes y particularmente en hojas viejas, dando lugar a un estrés oxidativo.

USO DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA AGRI-CULTURA

Una proporción importante de las áreas de cultivo no tienen las condiciones físico-químicas óptimas para el desarrollo de las plantas, por lo que es común que éstas sufran períodos bajo condiciones estresantes, que contribuyen a evitar que expresen a plenitud su potencial productivo. Se considera que la productividad récord más alta que se ha registrado para cada cultivo es un buen estimador del potencial productivo genéticamente determinado; utilizando este parámetro, Boyer (16) calculó el porcentaje del potencial genético que las plantas de los principales cultivos efectivamente realizan y encontró que, para los cultivos evaluados, cerca del 70% no se realiza por causas imputables a los factores abióticos del medio (tabla I). Esto nos da una idea del tremendo potencial que el desarrollo de técnicas que eviten o alivien los

efectos del estrés puede tener para mejorar el rendimiento de los cultivos.

Entre las múltiples estrategias que se desarrollan para aliviar los efectos del estrés sobresale el manejo del estrés oxidativo, ya que, como se mencionó en la introducción, diferentes condiciones estresantes producen gran parte de sus efectos adversos vía el aumento de especies reactivas de oxígeno. Esta estrategia puede implicar el uso de polioles como atrapadores de ROS, la ingeniería genética para el desarrollo de cultivos que sobre-expresen las enzimas clave y la aplicación de agroquímicos que actúen como antioxidantes o como activadores de los sistemas de defensa a ROS de las plantas.

La ingeniería genética es la que promete un gran abanico de opciones para aumentar la capacidad de las plantas para disminuir el estrés oxidativo y sus efectos, sin embargo éstas quedan fuera del alcance de este escrito. Como el uso de agroquímicos es la práctica que, con mucho, predomina sobre el uso de organismos transgénicos, la opción de desarrollar agroquímicos con propiedades antioxidantes pudiera tener mayor potencial en el corto plazo.

Un ejemplo actual, en ese sentido, es el uso del ácido N-acetil-4-tiazolidin carboxílico o acetil-tio-

TABLA I

ESTIMACIÓN DEL DIFERENCIAL ENTRE EL POTENCIAL GENÉTICO DE LOS PRINCIPALES CULTIVOS EN LOS EUA Y SUS RENDIMIENTOS REALES*

CULTIVO	RENDIMIENTO		ENFERMEDADES	PÉRDIDAS		
	RÉCORD	PROMEDIO		PLAGAS	MALEZAS	OTROS ^a
Maíz	19,300	4,600	750	691	511	12,700
Trigo	14,500	1,880	336	134	256	11,900
Soya	7,390	1,610	269	67	330	5,120
Sorgo	20,100	2,830	314	314	423	16,250
Avena	10,600	1,720	465	107	352	7,960
Cebada	11,400	2,050	377	108	280	8,590
Papa	94,100	28,300	8,000	5,900	875	50,900
Remolacha	121,000	42,600	4,700	6,700	5,700	61,300
Porcentaje		21.6	4.1	2.6	2.6	69.1

* Los datos son en Kg/Ha de producto cosechado y los promedios corresponden a las cosechas de 1975. Se considera que el rendimiento récord da una buena estimación del potencial genético de las variedades utilizadas hasta esa fecha. En la columna "Otros" quedan consignadas todas las pérdidas potenciales que se atribuyen a condiciones físico-químicas del medioambiente. Tomado de Boyer, 1982.

^a Calculado como récord-(promedio + plagas + malezas)

prolina, que se ha comercializado desde hace más de 30 años como un "bioestimulante" capaz de aumentar el rendimiento de los cultivos y de acelerar la recuperación de las plantas después de su exposición a un estrés. Si bien su uso está muy difundido, poco se conoce sobre su mecanismo de acción y en general se considera como una fuente de grupos -SH. En nuestro laboratorio hemos confirmado ese efecto bioestimulante y encontrado que aplicaciones foliares de tan solo 30 ppm de este compuesto son capaces de aumentar la resistencia de plántulas de maíz al estrés osmótico y al térmico, así como alargar la "vida en florero" de rosas, sugiriendo, en conjunto, que esta sustancia puede modificar la capacidad de la planta para manejar el daño oxidativo.

METABOLITOS SECUNDARIOS QUE PUEDEN TENER UNA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

El uso efectivo de esta sustancia nos permite suponer que el uso de agroquímicos puede ser efectivo en el manejo del estrés de los cultivos. Una fuente de sustancias con este potencial pueden ser las mismas plantas. El estudio de los metabolitos secundarios es el camino más utilizado para el descubrimiento de nuevos principios activos para fármacos; por lo que no es sorprendente que sea en las plantas donde se busquen moléculas capaces de reforzar los mecanismos antioxidativos de las células y se valore su potencial como medicamentos en el tratamiento de las enfermedades degenerativas asociadas con un aumento en los niveles de daño oxidativo. Estos estudios pueden extenderse para evaluar el potencial de esas moléculas en el desarrollo de agroquímicos antioxidantes.

Una sustancia puede ser considerada como un antioxidante si es capaz de inhibir a algún mecanismo generador de ROS, ya sea mediante la inhibición de enzimas generadoras, o por la quelatación de los metales que intervienen en la formación del radical hidroxilo, también por ser un atrapador de ROS o por estimular o proteger a las defensas antioxidantes de las células.

Diferentes estudios fitoquímicos han demostrado claramente que, además de los antioxidantes bien conocidos como lo son el ascorbato, el tocoferol y los carotenoides, otros metabolitos secundarios pueden ser considerados como antioxidantes. Un ejemplo muy claro son los flavonoides: algunos son inhibido-

res de enzimas involucradas en la generación de ROS como son la xantina oxidasa, lipo-oxigenasas y la NADH oxidasa. En general, los flavonoides muestran un potencial redox menor (0.23-0.75 V) al de las especies reactivas de oxígeno (1-2 V), por lo que pueden actuar como atrapadores de estas sustancias (17).

Un ejemplo puntual son las retrochalconas características de la *Glycyrrhiza* (una planta medicinal), que son capaces de inhibir la generación de radicales libres en el sistema xantina/xantina oxidasa, y son atrapadores del radical DPPH (difenil-p-picrilhidracil), e inhiben la peroxidación de microsomas inducida por Fe^{3+} ADP/NADPH (18).

REFERENCIAS

1. Davies K J (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61:1-31.
2. Levine A (1999) Oxidative stress as a regulator of environmental responses in plants. En: *Plant responses to environmental stresses (from phytohormones to genome organization)*, H.R.Lerner (ed), pp. 247-264. Marcel Dekker, Inc, New York.
3. Hamilton A (1991) Chemical and biochemical reactivity of oxygen. En: *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*, E. Pell et al (eds), pp. 6-12. Am Soc Plant Physiol, Rockville, Md.
4. Elstner E (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. En: *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*, E. Pell et al (eds), pp. 13-25. Am Soc Plant Physiol, Rockville, Md.
5. Lenaz G (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biochim Biophys Acta* 1366:53-67.
6. Vallentine J S, Wertz D, Lyons T, Liou L, Goto J y Gralla E (1998) The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr Opin Chemical Biol* 2:253-262.
7. Croteau D y Bohr V (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 272:25409-25412.
8. Berlett B y Stadtman E R (1977). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-20316.
9. Alscher R G, Donahue J L y Cramer C L 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol Plant* 100:224-233.

10. Hertwig, B, Steb, P y Feierabend, J (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol* 100:1547-1553.
11. Smirnoff N (2000) Ascorbic acid; metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* 3:229-235.
12. Edwards E A, Rawsthorne S y Mullineaux P M (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea. *Plant* 180:278-284.
13. Fryer M J (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environ* 15:381-392.
14. Havaux M (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci* 3:147-151.
15. Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* 50:601-639.
16. Boyer J S (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448.
17. Pietta P (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63: 1035-1042.
18. Haraguchi H, Ishikawa H, Mizutani K, Tamura Y y Kinoshita T (1998) Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorg Med Chem* 6:339-347.

PAPEL DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS CD8+ EN INFECCIONES POR PROTOZOARIOS INTRACELULARES

Norma Lilia Salaiza Suazo e Ingeborg Becker Fauser. Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. Dr. Balmis 148, Col. Doctores 06720 México, D.F. Tel.: 5623-2665, Fax: 57610249. Correo electrónico: salsua@servidor.unam.mx

Recibido: 20 de agosto de 1999. Aceptado: 17 de julio de 2001.

RESUMEN

Los parásitos y las bacterias intracelulares constituyen una categoría específica de microorganismos que se desarrollan y replican en los compartimentos intracelulares de las células huésped. Se ha estudiado la activación de fagocitos profesionales por citocinas secretadas por células T CD4+ como uno de los principales mecanismos protectores contra microorganismos intracelulares. Descubrimientos recientes sugieren que, como en las infecciones virales, la inmunidad protectora contra los parásitos y las bacterias intracelulares es mediada no sólo por linfocitos CD4+ sino también por linfocitos T citotóxicos CD8+.

PALABRAS CLAVE: Linfocitos T citotóxicos CD8+; protozoarios intracelulares; procesamiento de antígenos.

ABSTRACT

Intracellular bacteria and parasites constitute a specific category of micro-organisms that develop and replicate in the intracellular milieu of host cells. In the traditional view, activation of professional phagocytes by cytokines secreted from CD4+ T cells has been the major protective mechanism against intracellular bacteria and parasites. Recent discoveries, however, suggest that like in viral infections, protective immunity to intracellular bacteria and parasites is mediated not only by CD4+ lymphocytes but also by CD8+ cytotoxic T lymphocytes.

KEY WORDS: CD8+ cytotoxic T lymphocyte; intracellular protozoa parasites; antigen processing.

INTRODUCCIÓN

La patología de todas las enfermedades por parásitos intracelulares es el producto de una compleja serie de

interacciones entre éstos, su célula huésped y el sistema inmune, formándose una intrincada red de interacciones entre diferentes subpoblaciones celulares que secretan sustancias mediadoras (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores de inhibición) que activan los mecanismos de respuesta inmune humoral y celular que emplea el organismo para detener la infección. De manera complementaria el parásito desencadena diferentes mecanismos de evasión para evitar ser eliminado. Los patógenos intracelulares usan a la célula huésped no sólo para crear un medio ambiente intracelular óptimo para su crecimiento, sino también como un escudo para evadir mecanismos de defensa inmune humorales, tales como anticuerpos y complemento. La inmunidad protectora contra parásitos intracelulares es por lo tanto dependiente de la activación de mecanismos de defensa inmune celular por células T (1).

La importancia de las células T citotóxicas CD8+ en la inmunidad protectora a infecciones intracelulares ha sido reconocida mediante experimentos en ratones a los que se les eliminó el gene para $\beta 2$ -microglobulina. Esta globulina forma parte de la estructura de las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), por lo que estos animales tienen una deficiencia en la generación de linfocitos T citotóxicos CD8+, restringidos por moléculas clase I del MHC. Se observó que estos animales se vuelven altamente susceptibles a infecciones por patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* y *Trypanosoma cruzi*. Estas observaciones han generado controversias, ya que los patógenos intracelulares se encuentran en fagosomas y por lo tanto sus antígenos no son procesados en el citosol, en donde se procesan los antígenos cuyos péptidos serán presentados asociados a moléculas clase I del MHC,

que es el requisito indispensable para ser reconocidas por los linfocitos T CD8+.

El MHC es una región de genes muy polimórficos cuyos productos se expresan en la superficie de varias células. Las moléculas del MHC proporcionan un sistema para presentar los péptidos antigénicos a las células T. Hay dos tipos diferentes de productos de los genes del MHC llamados moléculas clase I (MHC I) y moléculas clase II (MHC II) y las células T son capaces de reconocer antígenos extraños unidos a estas clases de moléculas. CD4 y CD8 son glicoproteínas de superficie de la célula T que se unen a moléculas MHC y se encuentran en subpoblaciones de células T maduras mutuamente excluyentes (sólo pueden tener una clase de molécula, ya sea CD4 o CD8) con distintos patrones de restricción por MHC. CD4 se une directamente a moléculas clase II del MHC y se expresa en las células T cuyos receptores reconocen complejos formados por el péptido y moléculas clase II del MHC. La mayor parte de las células T CD4+ restringidas por la clase II muestran el fenotipo funcional de las células cooperadoras. CD8 se une a moléculas clase I del MHC y se expresa en las células T cuyos receptores reconocen complejos formados por el péptido y moléculas clase I del MHC. La mayor parte de las células T CD8+ restringidas por la clase I son linfocitos T citotóxicos.

I.- MECANISMOS CITOTÓXICOS DE LINFOCITOS T CD8+

1) RECONOCIMIENTO DE CÉLULAS INFECTADAS

a) Receptores

Los linfocitos T citotóxicos reconocen péptidos asociados no covalentemente con glicoproteínas clase I del MHC. La mayoría de los receptores de células T tienen una afinidad muy baja por el antígeno y la interacción del receptor de células T con el complejo MHC-péptido contribuye a la avidéz de la unión de los linfocitos T citotóxicos a las células blanco. Posteriormente, la unión del linfocito T citotóxico a la célula blanco se estabiliza por las interacciones de moléculas de adhesión con contrarreceptores en la célula blanco.

b) Presentación de antígenos

Los protozoarios que infectan las células del huésped son fagocitados y transportados al compartimento endosomal/lisosomal de la célula en donde entran a la

vía exógena de procesamiento de antígenos. En los endosomas acidificados los componentes proteicos de los parásitos son degradados a péptidos. Las vesículas que contienen los péptidos se fusionan con vesículas que transportan moléculas clase II del MHC para ser transportados a la superficie de la célula. La presentación de antígenos de este compartimento intracelular es restringida por moléculas clase II del MHC que estimulan a células T CD4+.

Los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos citosólicos que derivan de patógenos que viven dentro del citosol de células infectadas, como por ejemplo virus, que son degradados por los proteosomas y los péptidos antigénicos son llevados al lumen del retículo endoplásmico por un par de proteínas llamadas transportadoras de péptidos antigénicos (TAP-1 y TAP-2). Los péptidos se unen a moléculas clase I del MHC en el lumen del retículo endoplásmico y luego son transportados a través del complejo de Golgi hasta la superficie de la célula donde son presentados a los linfocitos T CD8+. Por lo tanto, esta respuesta contribuye a la resolución de la enfermedad por patógenos que se encuentran en el citosol de la célula. Sin embargo, se ha encontrado que el linfocito T CD8+ también participa en la eliminación de parásitos intracelulares. Se desconoce el mecanismo por el cual antígenos exógenos obtenidos por la fagocitosis de parásitos protozoarios, y que por lo tanto se encuentran en el compartimento endosomal/lisosomal, alcanzan la vía de moléculas clase I del MHC. Estudios recientes (2) han sugerido que existen células presentadoras de antígenos, entre las que se encuentra el macrófago, que pueden presentar antígenos exógenos asociados a moléculas clase I del MHC. Se han descrito dos posibles vías: Una que involucra el escape de antígenos del compartimento endosomal al citosol, y la otra que involucra una posible expulsión de péptidos de los fagosomas hacia la superficie de la célula, donde se unen a moléculas de clase I. Existen teorías adicionales sobre los posibles mecanismos mediante los cuales los antígenos endosomales pueden ser presentados en asociación con moléculas clase I del MHC. Pueden existir vías alternativas de procesamiento y en algunos casos los antígenos exógenos pueden alcanzar el citosol, particularmente si el sistema fagosomal/fagolisosomal está saturado de antígenos. Otro posible mecanismo de procesamiento vacuolar, no citosólico, puede involucrar la unión de péptidos a moléculas clase I del MHC den-

tro de compartimentos vacuolares post Golgi. Adicionalmente, las moléculas clase I del MHC pueden alcanzar los compartimentos vacuolares por medio de algunas vías potenciales que incluyen la internalización directa de la membrana plasmática durante la fagocitosis, co-localizando estas moléculas con el antígeno (3).

c) Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión de importancia para la interacción del linfocito T citotóxico CD8+ con la célula blanco son LFA-1/ICAM-I (CD11a-CD18/CD54) y CD2/LFA-3 (CD58). Adicionalmente, la mayoría de las células T CD8+ expresan CD28. Los ligandos para CD28 son B7.1 y B7.2 y se encuentran en la célula presentadora de antígeno. La interacción CD28/B7 media la adhesión y aumenta la proliferación y producción de citocinas de los linfocitos T CD8+ (4).

2) MOLÉCULAS EFECTORAS CITOTÓXICAS

Una vez que el linfocito T CD8+ reconoce a una célula que presenta antígenos asociados a moléculas clase I del MHC y se haya unido a ésta mediante moléculas de adhesión y receptores, los linfocitos T citotóxicos usan al menos tres mecanismos de muerte para lisar células infectadas: a) Perforinas/granzimas, b) Fas L/Fas y c) TNF- α .

a) Perforinas/granzimas

Los gránulos de linfocitos T citotóxicos contienen perforina, una proteína formadora de poros y granzimas, que son proteasas de serina. Se ha demostrado que la perforina y las granzimas actúan sinérgicamente induciendo la muerte de la célula blanco mediante apoptosis, con fragmentación del ADN y disolución de la membrana celular. La perforina, además de permitir la entrada de granzimas a la célula, también contribuye a la apoptosis inducida por éstas, ya que en experimentos realizados con perforina y con granzimas por separado, se observó que las granzimas por sí solas no eran capaces de inducir apoptosis. El reconocimiento del MHC clase I unido al antígeno induce la liberación de esas proteínas sobre las células blanco, lo cual induce la apoptosis. Esto se efectúa en un tiempo promedio de 7-10 minutos y es dependiente de temperatura y de iones Ca^{2+} (5). La perforina también tiene efecto citolítico sobre la célula blanco ya que la formación de canales en la membrana plasmática de la célula blanco lleva a defectos osmó-

ticos con excesiva entrada de iones de agua y de Ca^{2+} a la célula.

b) Fas L/Fas

Fas, también llamada CD95, es una proteína de 36kD que pertenece a una familia de proteínas representada por el receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNFR), entre los cuales se encuentran el receptor de TNF tipo uno (TNF-RI) y CD40, la molécula activadora de células B y macrófagos. En la mayoría de las poblaciones celulares, Fas y TNF-RI son receptores que inducen la muerte por apoptosis, mientras que el CD40 transmite señales anti-apoptóticas y proliferativas. Las células linfoides expresan Fas y la expresión de esta proteína en los linfocitos aumenta cuando éstos son estimulados por el antígeno. El ligando de Fas (Fas L) es una proteína de membrana que se expresa principalmente en los linfocitos T efectores CD4+ y CD8+. La activación de Fas por Fas L inicia la activación de una cascada de proteasas llamadas caspasas que llevan a la muerte de la célula por apoptosis. Fas es importante para mantener la homeostasis de los linfocitos. Ambos mecanismos, perforina y FasL/Fas, requieren interacciones del receptor de células T con el MHC y con el antígeno (TCR-MHC/Ag), lo cual activa la exocitosis de gránulos de perforina e induce la expresión de Fas L. La expresión de Fas L requiere de la síntesis de proteínas de novo en la célula T, por lo cual la lisis de la célula blanco por este mecanismo es más lenta que el mecanismo de exocitosis de gránulos de perforina.

c) TNF- α

Resultados de estudios en ratones han implicado claramente al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) como una importante citocina involucrada en el desarrollo de los linfocitos T citotóxicos. El TNF- α puede supra-regular la expresión de algunos antígenos de membrana y se considera que esta citocina puede incrementar la expresión de moléculas de adhesión de las células T (6). El TNF- α puede ser producido por macrófagos, células NK y linfocitos CD4+ y CD8+. Además de la activación celular, el TNF- α puede inducir directamente la apoptosis mediante su unión al receptor TNF-RI. De esta manera, el linfocito CD8+ citotóxico puede inducir la muerte de la célula blanco induciendo apoptosis por perforina/granzimas, así como por FAS L y TNF- α que se unen a TNF-RI.

II.- SECRECIÓN DE CITOCINAS POR LINFOCITOS TCD8+

Los efectos de las citocinas sobre los mecanismos inmunes involucrados en las parasitosis intracelulares son determinantes para la evolución de la infección. Se ha observado que los linfocitos CD8+ pueden secretar las citocinas interferón gama (IFN- γ) y TNF- α que son esenciales para generar una respuesta inmune celular protectora contra parásitos intracelulares.

III.- PARTICIPACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8+ EN ENFERMEDADES POR PROTOZOARIOS INTRACELULARES

a) *Leishmaniasis*

El parásito intracelular *Leishmania* representa un excelente modelo para analizar los mecanismos microbicidas mediados por los linfocitos CD8+. La *Leishmania* existe como amastigote dentro de los macrófagos de su huésped vertebrado. La mayoría de los estudios en leishmaniasis han demostrado que las células T CD4+ productoras de IFN- γ , son determinantes en conferir inmunidad protectora al huésped. Sin embargo, mediante la eliminación de las células T CD4+ en ratones BALB/c, Hill, Awwad y North (7) han demostrado que las células T CD8+ también son capaces de mediar inmunidad protectora en leishmaniasis murina.

También en la leishmaniasis cutánea humana se ha observado que la cura del huésped está asociada a un incremento de células CD8+ específicas contra *Leishmania*. En pacientes infectados con *L. braziliensis* y tratados con antimoniales pentavalentes (fármacos leishmanicidas) se observó un incremento de las células T CD8+ en la sangre periférica (8).

El papel protector de los linfocitos T CD8+ en la leishmaniasis aparentemente radica en su capacidad citotóxica sobre macrófagos infectados así como en su capacidad de secretar IFN- γ , la cual induce una respuesta inmune celular protectora.

b) *Toxoplasmosis*

Toxoplasma gondii es un protozoario intracelular obligado que infecta tanto a humanos como a animales. En la infección experimental por *T. gondii* se encontró que las células T CD8+ son determinantes para la inmunidad protectora. Se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ y CD8+ son necesarios para

controlar la infección aguda inicial así como para evitar que una toxoplasmosis crónica se reactive. Cuando se eliminan las células CD8+ en ratones, aumenta su susceptibilidad a la infección con *T. gondii* y la eliminación de CD4+ y CD8+ produce una elevada mortalidad. También se observó que la transferencia de células CD8+ de ratones inmunes a no inmunes confiere una protección más eficiente que la transferencia de CD4+. En experimentos en los cuales se infectan a macrófagos con *T. gondii* se encontró que linfocitos T CD8+ reconocen antígenos de *T. gondii* y ejercen su actividad citotóxica sobre ellos. Los mecanismos de inmunidad protectora mediada por células CD8+ dependen de la secreción de IFN- γ por estas células, así como de su actividad citotóxica (9).

c) *Tripanosomiasis*

T. cruzi es un parásito protozoario que produce la enfermedad de Chagas. En el huésped mamífero se puede encontrar en fase de tripomastigote en la sangre y en su fase de amastigote intracelular (dentro de las células que infecta). Ambos desencadenan una variedad de respuestas inmunes, que incluyen: la producción de anticuerpos líticos, la producción de citocinas por varias subpoblaciones de linfocitos, la activación de macrófagos y la inducción de células T CD8+, las cuales son necesarias para el control de *T. cruzi* en el huésped infectado (10). La contribución de las células T CD8+ a la inmunidad anti *T. cruzi* está bien documentada. Se ha encontrado un aumento en la parasitemia y en la mortalidad en ratones hechos deficientes en células T CD8+, mediante el tratamiento con anticuerpos anti CD8+ o anti $\beta 2$ microglobulina o en los ratones con deficiencia homocigótica (knockout) para CD8+. Adicionalmente, las células T CD8+ predominan en el infiltrado inflamatorio del tejido infectado con *T. cruzi*, donde ejercen un efecto protector regulando el nivel de parásitos y de células infectadas. Para la presentación de los antígenos de *T. cruzi* a las células T CD8+, el antígeno debe originarse o tener acceso al citoplasma de la célula huésped donde puede ser procesado a péptidos y presentado en asociación con moléculas clase I del MHC.

d) *Malaria*

Observaciones similares a las de *T. cruzi* se han hecho con *Plasmodium spp.*, un protozoario intracelular que produce paludismo. Trabajos recientes con algunas cepas de ratones han mostrado que después

de la inmunización con esporozoítos atenuados mediante radiación, hay un aumento de las células T CD8+, las cuales confieren protección contra la malaria. La protección pudo desaparecer por eliminación *in vivo* de las células T CD8+ (11). Aggarwal y col. (12) reportaron que una vacuna recombinante de *Salmonella* atenuada (que expresa el antígeno circumsporozoítico de *Plasmodium berghei*) y administrada por vía oral protege a ratones contra la malaria, mediante la inducción específica de linfocitos T CD8+ citotóxicos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El linfocito CD8+ participa en la defensa frente a los parásitos que sobreviven dentro de los macrófagos mediante dos mecanismos: 1.- Participa junto con otras células en la producción de citocinas de tipo Th1 (IFN- γ y TNF- α). Ambas citocinas tienen un efecto activador sobre el macrófago, lo que le permite eliminar a los parásitos y presentar los antígenos a otras células. 2.- Ejercen su actividad citotóxica sobre células infectadas, contribuyendo a eliminar nichos infecciosos. La contribución dual del linfocito T CD8+ a la resistencia contra infecciones intracelulares por parásitos protozoarios hace indispensable buscar moléculas del parásito que podrían utilizarse en el futuro en el diseño de vacunas que favorezcan la activación de linfocitos CD8+ citotóxicos.

REFERENCIAS

1. Kaufmann S H (1993) Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 11:129-63.
2. Harding C V y Song R (1994) Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I molecules. *J Immunol* 153:4925-4933.
3. Rui S y Harding C V (1996) Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta-2 microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* 156:4182-4190.
4. Nishio M (1996) CD80 (B7.1) and CD54 (Intracellular Adhesion Molecule-1) induce target cell susceptibility to promiscuous cytotoxic T cell lysis. *J Immunol* 157:4347-4353.
5. Smyth J M y Trapani A J (1995) Granzymes: exogenous proteinases that induce cell apoptosis. *Immunol Today* 16(4):202-208.
6. Scheutich P y Thomas B (1987) Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF-alpha): induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha mediated enhancement of T cells responses. *J Immunol* 138(6):1786-1790.
7. Hill J O, Awwad M y North R J (1989) Elimination of CD4 suppressor T cells from susceptible Balb/c mice releases CD8 T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. *J Exp Med* 169:1819-1827.
8. Da Cruz A M y Conceicao Silva F (1994) *Leishmania* - reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62:2614-2618.
9. Denkers E Y y Gazzinelli R T (1993) Bone Marrow macrophages process exogenous *Toxoplasma gondii* polypeptides for recognition by parasit specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 150:517-526.
10. Tarleton R L (1996) Immunity to *Trypanosoma cruzi*. In host response to intracellular parasites. SHE Kaufmann, Editor: RG Landes Co, Austin, TX 227-247.
11. Weiss W R y Sedegah M (1988) CD8+ T cells are required for protection in mice immunized with Malaria sporozoites. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(2):573-576.
12. Aggarwal A, Kumar S y Jaffe R (1990) Oral *Salmonella*: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. *J Exp Med* 172:1083-1090.

LAS RODOPSINAS: FOTORRECEPTORES DESDE LAS ARQUEOBACTERIAS HASTA LOS VERTEBRADOS

Shaday Michán. Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México D.F. Tel.: 5622-5655, Fax: 5622-5630. Correo electrónico: smichan@ifisiol.unam.mx

Recibido: 14 de febrero de 2001. Aceptado: 17 de julio de 2001.

RESUMEN

La luz regula una gran variedad de procesos de los seres vivos como: la fotosíntesis, la fototaxis, el fototropismo positivo y negativo, la morfogénesis, la diferenciación celular, la biosíntesis de pigmentos, el desarrollo de estructuras sexuales especializadas. La luz también modifica el comportamiento de los organismos y modula los ritmos circadianos. Los sistemas de fotorrecepción están constituidos por proteínas asociadas a un cromóforo que se excita al absorber la luz de una longitud de onda específica. Los estados intermedios del fotorreceptor, producidos desde la excitación hasta la recuperación del estado basal, son la señal celular que desencadena la respuesta al estímulo luminoso. En este artículo se utilizará a las rodopsinas, fotorreceptores que están presentes desde las arqueobacterias hasta los vertebrados, para analizar las bases moleculares que conforman el proceso de la fotorrecepción y las diversas modificaciones que permiten a los organismos percibir una amplia gama de estímulos luminosos.

PALABRAS CLAVE: fotorreceptor, cromóforo, fotociclo, absorción máxima.

ABREVIATURAS: BR, bacteriorrodopsina; HR, halorrodopsina; SRI y SRII, rodopsinas sensoras I y II; Htr I y II, proteínas transductoras de *Halo-bacterium*.

ABSTRACT

Light regulates several processes of living organisms such as photosynthesis, phototaxis, positive and negative phototropism, morphogenesis, cellular differentiation, biosynthesis of pigment and the development of sexual specialized structures. Light also modifies behavior and modulates circadian rhythmicity. The photoreception systems are formed

by proteins associated with a chromophore that is excited by absorption of light at a specific wavelength. The intermediary states of the photoreceptor, which are produced from excitation to the basal state recovery, constitute the cellular signals that initiate the response to a luminous stimulus. In this paper, the rhodopsins, photoreceptors which are present from archaeobacteria to vertebrates, will be used to analyze the molecular bases of photoreception processes and several modifications that enable organisms to perceive a wide spectrum of luminous stimuli.

KEY WORDS: photoreceptor, chromophore, photocycle, maximum absorption.

NATURALEZA DE LOS FOTORRECEPTORES

Las proteínas *per se* sólo absorben la luz de una longitud de onda, menor a 300 nm; sin embargo, cuando incorporan como grupo prostético un cromóforo aumentan su capacidad de captación luminosa en el intervalo visible. Cualquier cromo-proteína que al captar la luz del espectro visible produce una respuesta celular se considera como fotorreceptor.

Un cromóforo es una molécula fotoactiva que se excita con la absorción de un fotón de la región visible del espectro electromagnético. La capacidad de absorción del cromóforo depende de su estructura química. Por ejemplo, los que son polienos, como los carotenos y el retinal, se excitan con la luz de la región verde del espectro electromagnético; los cromóforos aromáticos, como el ácido *p*-cumárico, las flavinas y las pterinas absorben la luz azul; y los tetrapirroles, como la fitocromobilina, las clorofilas y las feofitinas, captan preferentemente los fotones de la región roja del espectro (1). Un cromóforo aisla-

do, por ejemplo el retinal, cuando se excita con la luz no es capaz de desencadenar una respuesta biológica; sin embargo, cuando éste se une a la proteína opsina, se forma la rodopsina que puede transmitir la señal de excitación luminosa en la célula.

Las rodopsinas son proteínas integrales de la membrana celular que presentan siete dominios α -hélice denominados hélice A, B, C, D, E, F y G. Las hélices B, C, F y G forman un poro transmembranal y el retinal que se encuentra unido por medio de una base de Schiff a un residuo de Lys conservado de la hélice G, interrumpe el poro a la mitad y separa el canal citoplásmico del canal extracelular (Fig. 1A). Las formas del retinal presentes en las rodopsinas pueden ser: todo-*trans*-retinal, 11-*cis*-retinal o 3-deshidroretinal (Fig. 2).

Las mutaciones en las opsinas y la incorporación de diferentes formas de retinal producen la variedad de rodopsinas que se conocen hasta el momento: desde las que funcionan como un sistema fotosintético en las arqueobacterias, hasta las que forman los pigmentos visuales que les permiten a los vertebrados percibir el color.

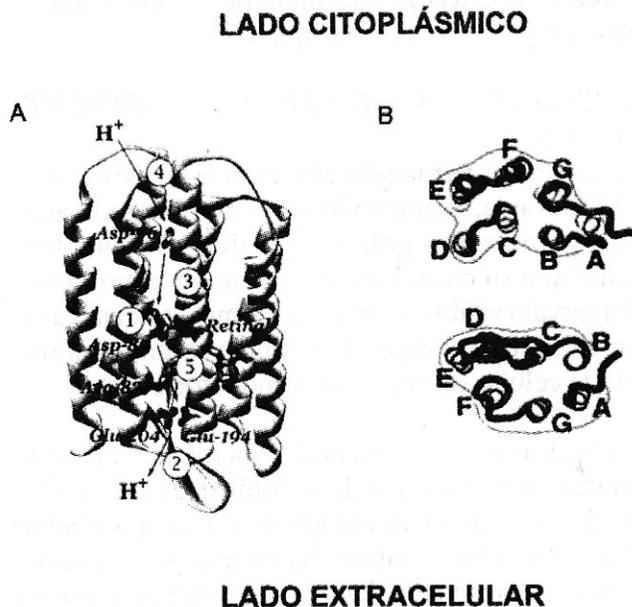


Figura 1. Estructura terciaria de la bacteriorrodopsina. Se observan las siete hélices transmembranales y el retinal en la parte central (A). La proteína vista desde la parte de arriba muestra el poro que forman las hélices B, C, F y G en el canal citoplásmico (B superior). En el canal extracelular, las mismas hélices están expuestas al exterior y aumenta el diámetro del poro (B inferior). Figura tomada de Luecke *et al.* (4) y Oesterhelt *et al.* (5).

LAS ARQUEORRODOPSINAS: CUATRO FUNCIONES FOTORRECEPTORAS DIFERENTES

La bacteriorrodopsina (BR), la halorrodopsina (HR), la rodopsina sensora I (SRI) y la rodopsina sensora II (SRII) son las rodopsinas que constituyen el sistema de fotorrecepción arqueobacteriano. Todas son proteínas de 26 kDa que unen al todo-*trans*-retinal. De las 30 arqueorrodopsinas reportadas, todas coinciden con el espectro de absorción y la función de la BR, HR, SRI o SRII. La comparación de la secuencia primaria de las cuatro tipos de opsinas muestra un porcentaje de identidad entre el 20 y el 30% (2).

Las arqueorrodopsinas se descubrieron en *Halo bacterium salinarium*, especie halófila extrema que vive en ambientes en donde la concentración de NaCl es mayor a 4 M y la radiación solar es muy intensa. Cuando la concentración de oxígeno en el medio es elevada *H. salinarium* sintetiza la SRII. La SRII o foborrodopsina al mediar la respuesta fototáctica negativa a la luz azul-verde, favorece la ubicación de *H. salinarium* en zonas oscuras y con esto evita los daños foto-oxidativos potenciales a los que está expuesta la bacteria cuando la radiación de la luz solar va acompañada de concentraciones elevadas de oxígeno.

Sin embargo, cuando el oxígeno del medio disminuye, se detiene la síntesis de la SRII y en cambio se

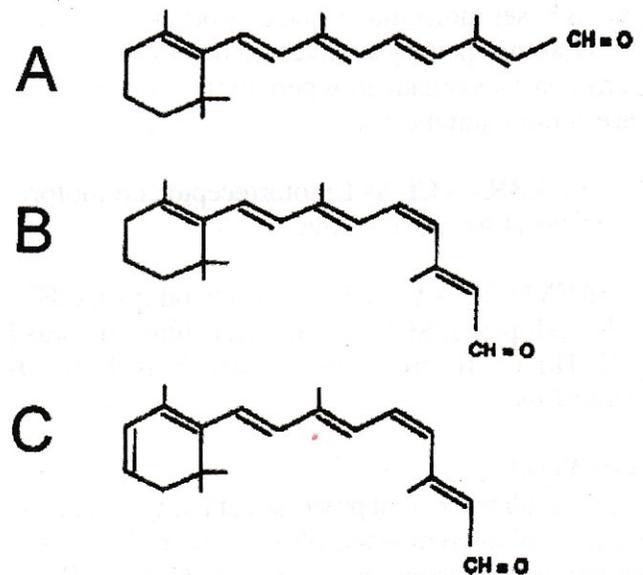


Figura 2. Formas del retinal acopladas a las rodopsinas. El todo-*trans*-retinal es el cromóforo de las arqueorrodopsinas (A), el 11-*cis*-retinal de los invertebrados y vertebrados (B) y el 3-deshidroretinal de algunos peces y anfibios (C). Figura tomada de Yokoyama y Yokoyama (13).

presentan la BR, HR y SRI. La SRI regula el comportamiento fototáctico positivo hacia la luz anaranjada y negativo a la radiación UV, así la bacteria logra ubicarse en ambientes con suficiente radiación luminosa anaranjada y libre de fotones UV. Estas mismas condiciones garantizan el bombeo eficiente de H⁺ por la BR y el de Cl⁻ por la HR, favoreciendo la síntesis del ATP en condiciones anaerobias (3).

La BR es la proteína más abundante en la membrana púrpura de *H. salinarium*. Funciona esencialmente como un sistema fotosintético, ya que un fotón de luz visible resulta suficiente para excitar al cromóforo y generar un fotociclo que culmina con la liberación de un protón al exterior de la membrana plasmática. La energía luminosa, transformada de esta manera en energía electroquímica es utilizada por la bacteria para la síntesis del ATP.

Al inicio del fotociclo, las 7 hélices de la BR adquieren un arreglo espacial presentando el poro del canal extracelular abierto y el del canal citoplásmico cerrado (Fig 1B). En esta conformación, la base de Schiff mantiene comunicación únicamente hacia el lado extracelular. El fotociclo comienza (Fig. 1 y 3)

cuando el todo-*trans*-retinal de la BR₅₇₀ (el subíndice es la absorción máxima de cada intermediario) absorbe la energía de un fotón y se fotoisomeriza a la configuración 13-*cis*, etapa I, en la que se forman los intermediarios J₆₀₀ y K₅₉₀. Esto promueve que la base de Schiff protone al Asp-85, localizado en el canal extracelular de la proteína. Con la participación de la Arg-82 y a través de una intrincada red de moléculas de agua, el Glu-204 libera un protón a la zona extracelular de la membrana (etapa T, con la formación del intermediario L₅₅₀). Posteriormente un cambio conformacional grande de la proteína cierra el canal extracelular y abre el canal citoplásmico, promoviendo el acceso de protones del citoplasma (etapa S, intermediario M₄₁₀). Diez milisegundos más tarde, la base de Schiff es reprotonada por el Asp-96 (etapa T₂, intermediario N₅₆₀) y éste, a su vez, obtiene un protón del lado citoplásmico de la membrana. Sólo unos cuantos milisegundos después, se reisomeriza el retinal al todo-*trans*-retinal produciendo el intermediario O₆₄₀ (etapa I₂). Finalmente, un segundo cambio conformacional de la proteína promueve la transferencia del protón del Asp-85 al Glu-204 recuperándose así el estado inicial BR₅₇₀ (etapa S₂) (4 y 5).

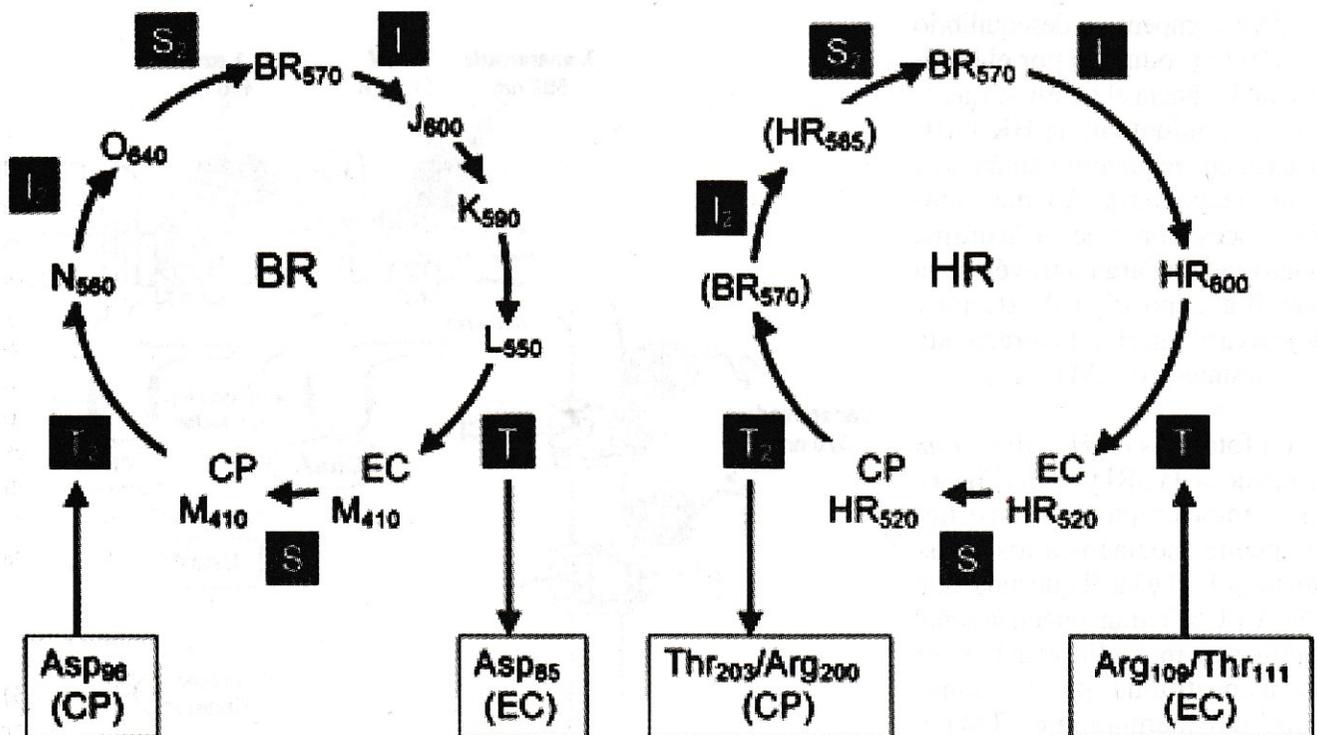


Figura 3. Fotociclos de la bacteriorrodopsina (BR) y de la halorrodopsina (HR). EC=lado extracelular y CP=lado citoplásmico. Ver detalles en el texto. Figura modificada de Oesterhelt *et al.* (5).

La única bomba de aniones que se conoce en los seres vivos es la HR. El principio del mecanismo de translocación del Cl^- por la HR es el mismo que del bombeo de H^+ por la BR. La secuencia de las reacciones en ambos casos es (Fig. 3): 1) la isomerización del retinal de todo-*trans* a 13-*cis*, 2) la obtención de Cl^- extracelular (o la expulsión de H^+ por la BR), 3) el cambio conformacional de la proteína; 4) la reisonerización del retinal de 13-*cis* a todo-*trans*, 5) la liberación del Cl^- al citosol (o captación de H^+ del citosol) y 6) el cambio de la proteína para adquirir la conformación inicial.

Todas las HR presentan conservados los residuos Arg-108 y Thr-111 del lado extracelular y los residuos Arg-200 y Thr-203 en el lado citosólico. Ambos pares de residuos están colocados en posición simétrica a la base de Schiff y sustituyen en función a los residuos Asp-85 y Asp-96 de la BR, respectivamente. La Thr-111 aumenta la afinidad de la Arg-108 por el Cl^- del lado extracelular, mientras que la liberación del Cl^- al citosol es catalizada por la cadena lateral de la Thr-203. La sustitución del residuo de Asp-85 por una Thr convierte a la BR en una bomba de Cl^- hacia el citoplasma (6).

El bombeo de Cl^- al interior de la célula compensa el desequilibrio osmótico producido por el bombeo de H^+ hacia el exterior. La actividad conjunta de la HR y BR mantienen el equilibrio osmótico de la arqueobacteria. Además, ambos procesos promueven la misma polaridad de carga a través de la membrana, positiva al exterior y negativa al interior, favoreciendo esto la síntesis del ATP.

La fototaxis en *H. salinarium* depende de la SRI y SRII (Fig. 4). Estos fotorreceptores están estrechamente asociados a los transductores HtrI y HtrII que junto con CheA y CheY transducen la señal luminosa al motor flagelar. Las Htr están constituidas por dos dominios transmembranales TM1 y TM2 que interaccionan con las SR y desencadenan la cascada de se-

ñalización. También presentan un dominio de unión a cinasas de histidina y dos dominios de metilación. CheA y CheY que son homólogos al sistema de dos componentes que regulan la quimiotaxis en *E. coli*. CheA es una cinasa de histidina que se autofosforila, CheY desfosforila a CheA y cuando CheY está fosforilado interactúa con el motor flagelar y cambia el sentido de la rotación del haz de flagelos polar. La modificación en el estado de metilación de las Htr produce la señal de adaptación al estímulo luminoso (7).

La absorción de un fotón de luz anaranjada por el todo-*trans*-retinal de la SRI ($A_{\text{max}}=587 \text{ nm}$) produce un fotociclo con tres intermediarios: S_{610} , S_{560} y S_{373} (Fig. 5A). La interacción de la S_{373} con la HtrI mantiene constante la rotación flagelar y permite que la bacteria se ubique en lugares donde la intensidad de la luz anaranjada es óptima. Cuando en el medio además de luz anaranjada hay luz UV-cercana, se produce un ciclo alterno en donde la S_{373} se activa con la absorción de un fotón de 373 nm y se convierte en la S_{510} (ciclo de dos fotones). La interacción de ésta con la HtrI induce el cambio de la rotación flagelar, alejando a la bacteria del estímulo (3). El decaimiento de la S_{373} al estado inicial SR_{587} es 10 veces más rá-

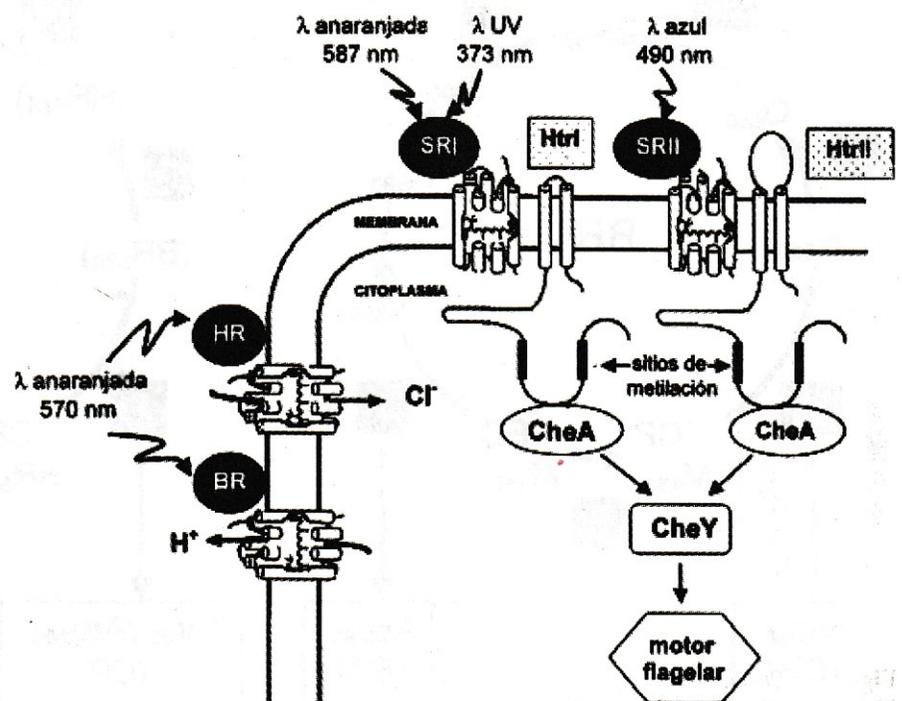


Figura 4. Las 4 arqueorrodopsinas. Ver detalles en el texto. Figura modificada de Hoff *et al.* (3).

pido en el ciclo de dos fotones vía el intermediario S^b_{510} que en el ciclo en donde sólo incide la radiación anaranjada. Con la integración de ambos fotociclos las arqueobacterias se ubican no sólo en una zona iluminada con luz anaranjada, sino también libre de la radiación UV.

A pesar de que la base de Schiff se desprotona y protona durante la formación y el decaimiento de la S_{373} , la SRI asociada a la HtrI, no es electrogénica. Sin embargo, cuando se le separa del transductor adquiere la función de la BR, es decir, bombea H^+ hacia afuera de la célula.

En contraste, en la SRII circulan protones por el canal extracelular. La $S-II_{360}$ (equivalente al intermediario M de la BR) toma un H^+ del lado extracelular de la membrana y la $S-II_{540}$ (equivalente al intermediario O de la BR) lo libera ahí mismo (8). La base de Schiff de la SRII no tiene acceso al canal citoplásmico durante el fotociclo, de tal forma que la conductividad del H^+ en esa zona es reducida en comparación con la BR y SRI. Esta conductividad baja y el flujo de H^+

al exterior se mantienen aún cuando la SRII está unida a su transductor HtrII.

Los intermediarios $S-II_{360}$ y $S-II_{540}$ que se forman cuando la $SRII_{490}$ es iluminada son los que interaccionan con la HtrII y generan la respuesta repelente a la luz azul.

Tanto en la SRI como en la SRII el residuo de Asp-85 de la BR se conserva como Asp-76 y Asp-73 respectivamente y el residuo Asp-96 es reemplazado en ambas por una Tyr. El Asp-76 de la SRI permanece neutro durante la fototaxis; sin embargo, cuando a la SRI se le separa del transductor y se vuelve electrogénica, el Asp-76 es el residuo que protona la base de Schiff. A diferencia de la SRI el residuo Asp-73 de la SRII sí se protona durante el fotociclo.

El residuo de Met-118 de la BR está en la cavidad de la proteína donde se encuentra el retinal; la HR y la SRI también tienen esa metionina conservada. Sin embargo, en la SRII está sustituida por un residuo de Val-106. El tamaño del aminoácido que reemplaza a la Met-118 afecta el espectro de absorción del cromóforo. La comparación con otras arqueorodopsinas sugiere que esta sustitución es la responsable de la disminución en la absorción máxima de la SRII. A diferencia de la BR, HR y SRI que tienen una absorción máxima mayor de 500 nm, la de la SRII es de 487 nm (3).

El movimiento de las hélices F y G de la SRI_{373} es transmitido por la interacción directa de éstas con el dominio transmembranal TM2 de la HtrI. Las mutantes de la SRI que invierten la respuesta fototáctica, generan un movimiento del TM2 en dirección opuesta (9). La diferencia en el movimiento de las hélices F y G, junto con la variación en la protonación de los residuos Asp-76 (en la SRI) y Asp-73 (en la SRII) durante el fotociclo, podrían ser parte de las señales que generan las diferentes respuestas de las SR.

LAS RODOPSINAS: POLIMORFISMO QUE PERMITE PERCIBIR LOS COLORES

En las algas también se han encontrado rodopsinas. *Chlamydomonas reinhardtii* tiene una mancha ocular de color anaranjado de 1 a 1.5 μm de diámetro localizada en posición ecuatorial. En la mancha ocular está concentrada la clamidorodopsina, una prolar

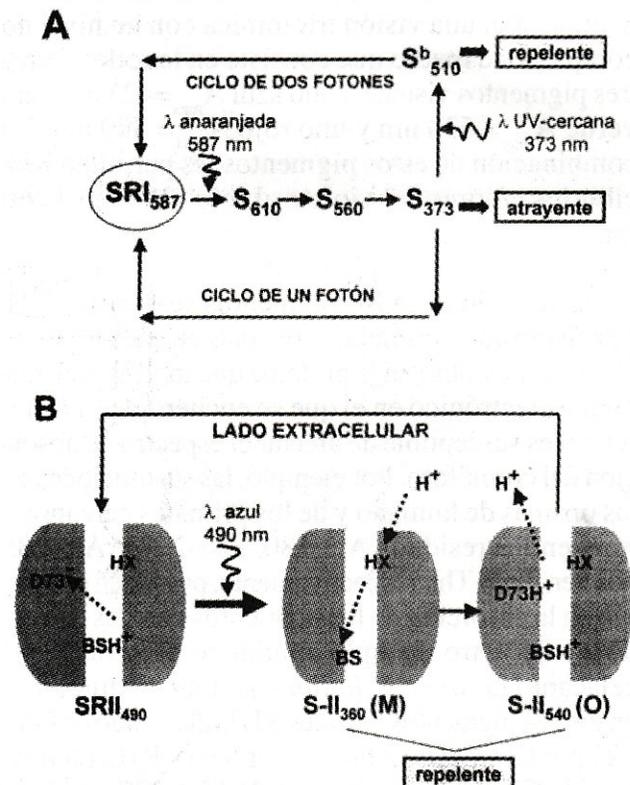


Figura 5. Fotociclo de la rodopsina sensora I y II (SRI y SRII). (A) El fotociclo de la SRI y (B) de la SRII. BS=Base de Schiff Ver detalles en el texto. Figura modificada de Hoff *et al.* (3) y Sasaki y Spudich (7).

teína de 30 kDa responsable de orientar a las células en dirección al estímulo luminoso (10).

A pesar de tener asociado al cromóforo todo-*trans*-retinal, la clamidorrodopsina tiene una estructura primaria que difiere significativamente de las arqueorrodopsinas, pero es bastante similar a las opsinas de invertebrados.

Volvox carteri es un alga colonial esférica, compuesta por 16 células reproductoras grandes (gonidias) y de 2,000 a 4,000 células somáticas. Las gonidias se encuentran en la parte interna de la colonia rodeadas por las células somáticas que las recubren. Cada una de estas últimas tienen 2 flagelos y una mancha ocular y son las encargadas de guiar a la colonia a lugares con condiciones óptimas de luz. *Volvox* responde a la luz de una longitud de 490 nm a 520 nm.

La secuencia de aminoácidos de la volvoxopsina muestra un 61% de identidad con la clamioopsina. Ambas secuencias contienen un sitio típico de unión al retinal en el carboxilo-terminal y tienen características que comparten diversos canales de iones (11).

El mecanismo de fototransducción en las algas activa los canales de Ca^{++} e hiperpolariza la membrana del fotorreceptor, generando con esto la señal eléctrica que modifica el movimiento flagelar.

Aunque sólo se han clonado los genes de las algas *Chlamydomonas* y *Volvox*, datos bioquímicos indican que *Euglena gracilis* y *Spermatozopsis similis* también presentan rodopsinas asociadas al todo-*trans* retinal.

En el hongo filamentoso *Neurospora crassa*, también se ha reportado la existencia de una opsina, la neurosporopsina (NOP-1) que une el todo-*trans*-retinal por medio de una base de Schiff. Tiene una absorción máxima a 534 nm y genera un fotociclo espectrofotométricamente similar al de la BR, SRI y SRII. Las mutantes *nop-1* no presentaron daño alguno en la fisiología del hongo regulada por la luz. Además, la NOP-1 presenta conservados los residuos que en la BR son indispensables para el bombeo de H^+ (los residuos de Asp-85 y Asp-96 de la BR se encuentran como Asp y Glu en *N. crassa*). Estos datos sugieren que posiblemente la NOP-1 tiene la función de bombear H^+ (12).

A diferencia de las algas y los hongos, los pigmentos que forman el sistema visual y de percepción del color en los invertebrados y en los vertebrados son las opsinas que unen el *11-cis*-retinal (aldehído de la vitamina A1).

El común denominador del sistema visual de los vertebrados está constituido por tres pigmentos: uno con una absorción máxima menor a 500 nm, otro mayor de 500 nm y la rodopsina igual a 500 nm. Esta última se encuentra en las células fotorreceptoras de la retina, conocidas como los bastones y se utiliza en condiciones de luz tenue. Los otros pigmentos visuales que participan en la percepción del color se localizan en los conos y se utilizan únicamente en presencia de luz de mayor intensidad.

Los componentes de la visión de color en los vertebrados varían ampliamente. Por ejemplo, los pollos presentan, además de la rodopsina, cinco pigmentos visuales: cuatro son conales y la pinopsina localizada en la glándula pineal; sin embargo, la mayoría de los mamíferos tienen sólo tres pigmentos. El hombre y los primates más relacionados con éste presentan una visión tricrómica con un nivel de complejidad medio que consiste en la rodopsina y tres pigmentos visuales: uno azul $A_{\text{max}} = 425$ nm, uno verde $A_{\text{max}} = 530$ nm y uno rojo $A_{\text{max}} = 560$ nm. La combinación de estos pigmentos les permiten percibir los colores del violeta al rojo (380 nm a 760 nm) (13).

La diversidad de los pigmentos se debe al polimorfismo que presentan la opsinas en cada especie. Cualquier cambio en la proteína que modifica el ambiente electrónico en el que se encuentra el *11-cis*-retinal es susceptible de afectar el espectro de absorción del cromóforo. Por ejemplo, las sustituciones en las opsinas de humano y de los primates cercanos a éste, en los residuos Ala-180, Phe-277 y Ala-285 por Ser, Tyr y Thr, respectivamente, producen el cambio en la absorción de los pigmentos conales de verde a rojo. Otro ejemplo similar se presenta en el celacanto *Latimeria chalumnae*. Las sustituciones en los dos pigmentos visuales RH1 (el residuo de Glu-122 por Gln y el de Ala-292 por Ser) y RH2 (el residuo de Glu 122 por Gln y el de Met-207 por Lys) cambian la absorción máxima a 478 nm y 485 nm respectivamente. Estas modificaciones le permiten al celacanto percibir todo el espectro de la luz que inci-

de a 200 m de profundidad en el Océano Índico, hábitat iluminado con luz cercana a 480 nm (14).

Algunos vertebrados como las lampreas, los peces y los anfibios, además del *11-cis*-retinal también pueden presentar como cromóforo el 3-deshidrorretinal (aldehído de la vitamina A2). La adición de un doble enlace en el 3-deshidrorretinal cambia la absorción máxima a una longitud de onda más larga. La proporción relativa de los cromóforos se regula por factores como la luz, la estación del año, la migración, la temperatura y las concentraciones hormonales. El aumento en la síntesis de 3-deshidrorretinal les permite adaptarse a ambientes iluminados con una longitud de onda mayor. Por ejemplo, cuando *Anguila rostrata* habita en las profundidades del mar utiliza el *11-cis*-retinal, pero al migrar a lugares de agua dulce incorpora el 3-deshidrorretinal. En este caso, la misma opsina puede interactuar con uno u otro cromóforo, modificando la absorción máxima de 501 a 523 nm, respectivamente.

El camaleón americano es el único vertebrado terrestre que utiliza solamente al 3-deshidrorretinal como cromóforo y su sistema visual está constituido únicamente por conos. Este pigmento presenta una absorción mayor hacia el rojo ($A_{\max}=625$ nm) que cualquier otro fotorreceptor de los vertebrados terrestres.

El fotociclo de las rodopsinas de los vertebrados también se inicia con la isomerización del retinal, pero, a diferencia de las arqueorodopsinas, el *11-cis*-retinal se isomeriza a la configuración *todo-trans*. En ambos casos el proceso es muy rápido, 3 ps y 200 fs respectivamente.

La absorción de luz por la rodopsina genera la lumirrodopsina. La isomerización del retinal produce la metarrodopsina I, primer intermediario de vida media larga del fotociclo. La ruptura del puente salino formado entre el residuo de Glu-113 y la base de Schiff de la metarrodopsina I ($A_{\max}=478$ nm), produce la transición hacia la metarrodopsina II ($A_{\max}=380$ nm) (15). Una molécula de metarrodopsina II puede activar secuencialmente cientos de proteínas G heterotriméricas (transducinas) que inducen a las fosfodiesterasas y cada una de éstas hidroliza miles de moléculas de cGMP. La disminución en la con-

centración de cGMP cierra los canales de iones (Na^+ y Ca^{++}), reduciéndose el flujo de éstos al interior de la célula fotorreceptora. La señal eléctrica es resultado de la hiperpolarización de la membrana celular.

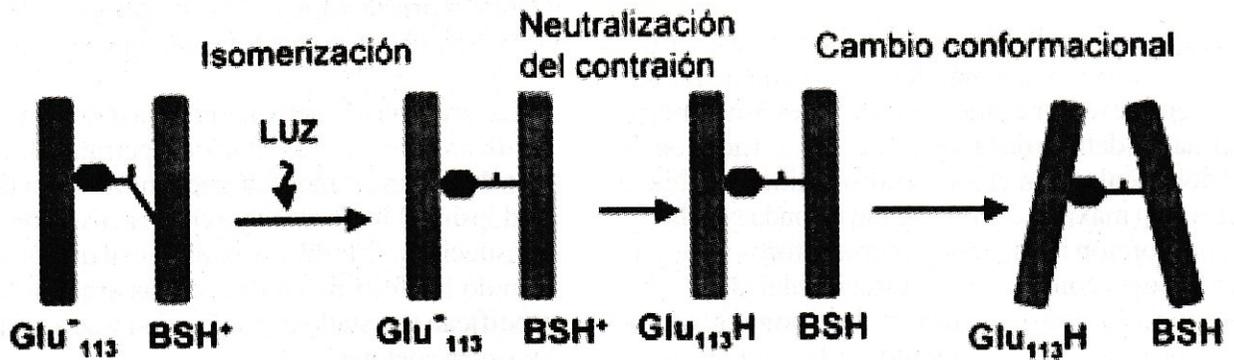
La arrestina y la activación de la rodopsina-cinasa nulifican la señal de excitación y permiten la adaptación del fotorreceptor. La arrestina atrapa a la metarrodopsina II fosforilada y evita la activación de más transducinas. Este efecto es similar al que se observa cuando los fotorreceptores de las arqueobacterias modifican su estado de metilación y se adaptan a la radiación continua.

Un segundo después de que se forma la metarrodopsina II, el complejo se disocia en el *todo-trans*-retinal y la opsina. El *todo-trans*-retinal es reisolomerizado a *11-cis*-retinal por la retinal isomerasa; este último es utilizado en la síntesis de nuevos pigmentos visuales que inician otro ciclo y mantienen el proceso de la visión.

En las rodopsinas de los invertebrados un residuo Tyr sustituye el Glu-113 conservado en los vertebrados (con excepción de algunos pigmentos que absorben UV y que presentan en esa posición una Phe). La ausencia del residuo con carga negativa elimina un paso en el fotociclo, de tal manera que después de la isomerización, la rodopsina directamente cambia de conformación y se transforma en la metarrodopsina II (Fig. 6) (16). Ésta, con la base de Schiff protonada, transfiere la señal luminosa a una proteína G heterotrimérica y, a diferencia de los vertebrados, la cascada de señalización continúa con la activación de la fosfolipasa-C que cataliza la conversión de fosfoinositol-bisfosfato a inositol-trifosfato y diacilglicerol. La activación de la fosfolipasa-C produce la hiperpolarización de la célula fotorreceptora. Contrariamente a lo que sucede en los vertebrados, los canales de iones se abren aumentando el flujo de Ca^{++} y Na^+ hacia el interior de la célula fotorreceptora.

Aun cuando la fototransducción en vertebrados e invertebrados tiene efectos opuestos sobre los canales iónicos (cierre y apertura), las cascadas de señalización comparten características como: la sensibilidad a diversas intensidades de luz, la respuesta rápida y temporal hacia el estímulo y la capacidad de amplificar la señal luminosa.

Vertebrados



Invertebrados

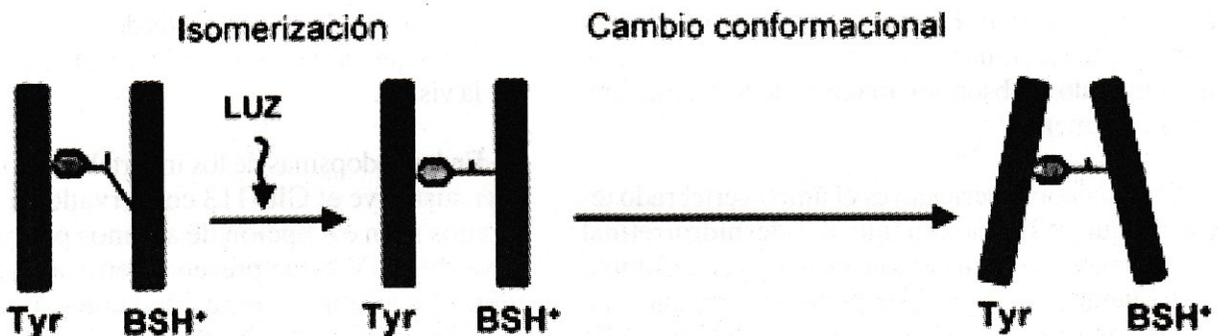


Figura 6. Activación por luz de las rodopsinas de vertebrados e invertebrados. Ver detalles en el texto. Figura modificada de Nakagawa *et al.* (16).

COMENTARIOS FINALES

No todos los organismos que responden al estímulo luminoso presentan rodopsinas; por ejemplo, las plantas carecen de éstas, pero tiene otros fotorreceptores como los fitocromos y los criptocromos.

En las eubacterias tampoco se han encontrado rodopsinas. Sin embargo, el mecanismo de fotoactivación de la PYP, fotorreceptor de luz azul de *Ectothiorhodospira halofila*, es similar al de las rodopsinas. La luz produce el cambio de configuración de *trans* a *cis* del ácido *p*-cumárico, generando cambios conformacionales en la proteína que desencadenan la fototaxis negativa de la bacteria.

Los estudios filogenéticos sugieren que las arqueorodopsinas son una familia de proteínas homólogas que evolucionaron a partir de tres eventos independientes de duplicación génica. Una primera duplicación

de la rodopsina ancestral (parecida a la BR) generó a la proto-BR y a la proto-SR-II; y la duplicación de cada una de éstas, originó a la BR y HR y a la SR-I y SR-II, respectivamente.

La presencia de todo-*trans*-retinal en las arqueorodopsinas, en las rodopsinas de algas y en las de hongos sugiere que éste es el cromóforo ancestral.

Con base en el análisis filogenético, se considera que las rodopsinas de eucariotes son un grupo de proteínas que evolucionaron a partir de un ancestro común. Éste posiblemente presentaba características similares a las opsinas de algas.

Debido a la enorme diferencia en la secuencia de aminoácidos de las rodopsinas de arqueobacterias y de eucariotes, ha sido difícil deducir el proceso evolutivo que originó estas últimas. No es claro si ambos

grupos corresponden a proteínas homólogas que divergieron en el transcurso de la evolución o si son proteínas análogas, con diferente origen evolutivo pero estructura similar.

Si bien se conocen las secuencias de aminoácidos de varias rodopsinas de arqueobacterias, invertebrados y vertebrados, sólo se han reportado dos de algas y una de hongos. Es necesario contar con un número mayor de genes de opsinas de protoctistas y hongos para reconstruir la historia evolutiva y determinar si el origen de las rodopsinas de las arqueobacterias y de eucariotes fue monofilético (a partir de un ancestro en común) o parafilético (con diferentes ancestros).

REFERENCIAS

- Hallingwerf K J, Hoff W D y Crieleard (1996) Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signalling. *Mol Microbiol* 21:683-693.
- Mukohata Y, Ihara K, Tamura T y Sugiyama Y (1999) Halobacterial rhodopsins. *J Biochem* 125:649-657.
- Hoff W D, Jung K-H y Spudich J L (1997) Molecular Mechanism of photosignaling by archaeal sensory rhodopsins. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 26:223-258.
- Luecke H, Schobert B, Richter H T, Cartailler J-P y Lanyi J K (1999) Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2-angstrom resolution. *Science* 286:255-260.
- Oesterhelt F, Oesterhelt G, Pfeiffer M, Engel M, Gaub H E y Mülle D J (2000) Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science* 288:143-146.
- Oesterhelt D (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr Op Struct Biol* 8:489-500.
- Rudolph J, Tolliday N, Schmidtt, Schuster S C y Oesterhelt (1995) Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J* 14:4249-4257.
- Sasaki J y Spudich L (1999) Proton circulation during the photocycle of sensory rhodopsin II. *Biophys J* 77:2145-2152.
- Zhan Xue-N, Zhu J y Spudich J L (1999) The specific of interaction of archaeal transducers with their cognate sensory rhodopsins is determined by their transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:857-862.
- Sineshchekov O A y Govorunova E G (1999) Rhodopsin-mediated photosensing in green flagellated algae. *Trends Plant Sci* 4:58-63.
- Ebnet E, Fischer M, Dininger W y Hegemann (1999) Volvoxrhodopsin, a light-regulated sensory photoreceptor of the spheroidal green alga *Volvox carteri*. *Plant Cell* 11:1473-1484.
- Bieszke J A, Braun E L, Bean L E, Kang S, Natvig D O y Borkovich K (1999) The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8034-8039.
- Yokoyama S y Yokoyama R (1996) Adaptative evolution of photoreceptors and visual pigments in vertebrates. *Ann Rev Ecol Sys* 27:543-567.
- Yokoyama S (2000) Color vision of the Coelacanth (*Latimeria chalumnae*) and adaptative evolution of rhodopsin (RH1) and rhodopsin-like (RH2) pigments. *J Hered* May-Jun; 91:215-220.
- Meyer C, Böhme M, Ockenfels A, Gärtner W, Hofmann K P y Ernst O P (2000) Signaling states rhodopsins: retinal provides a scaffold activating proton transfer switches. *J Biol Chem* 275:19713-19718.
- Nakagawa M, Isawa T, Kikkawa S, Tsuda M y Ebrey T (1999) How vertebrate and invertebrate visual pigments differ in their mechanism of photoactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6189-6192.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Ricardo Jasso Chávez y Rafael Moreno Sánchez

TEMA: Cinética enzimática Inhibición de tipo mixto.

La L-lactato deshidrogenasa del protista *Euglena gracilis* es una enzima localizada en la membrana interna mitocondrial, es independiente de piridín nucleótidos (L-iLDH) y está conectada a la cadena respiratoria. En sistemas bacterianos esta enzima se inhibe por oxalato de manera competitiva o no com-

petitiva. Los parámetros cinéticos de la L-iLDH se determinaron en mitocondrias aisladas variando las concentraciones de L-lactato en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor. La actividad enzimática de la L-iLDH se midió espectrofotométricamente mediante la reducción a 600 nm del 2,6-Diclorofenolindofenol (DCPIP) como el aceptor artificial de electrones a 30° C y pH de 7.6. A continuación se presentan las velocidades iniciales.

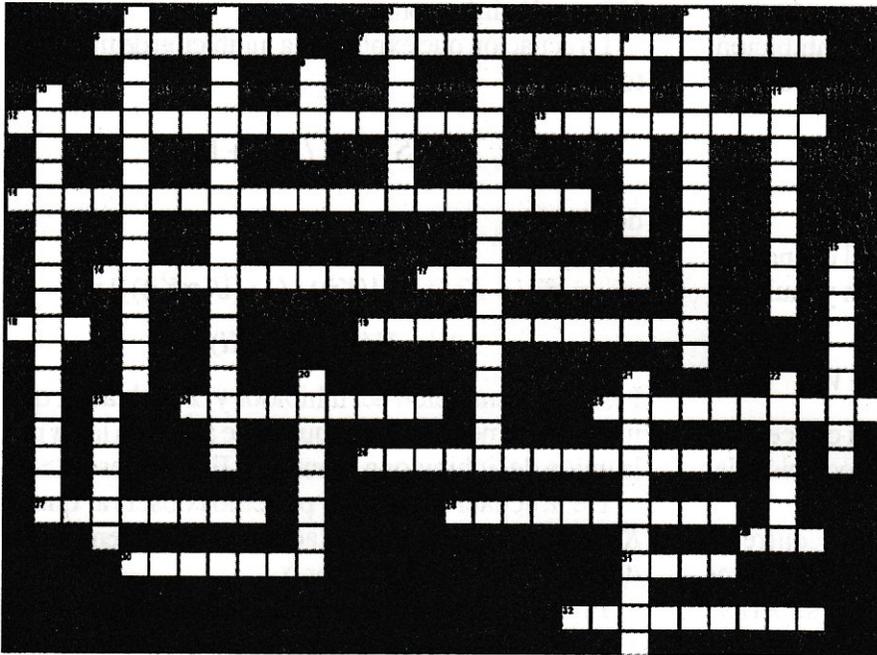
ACTIVIDAD DE L-iLDH (nmol/min/mg prot)						
	[oxalato] mM					
[L-lactato] mM	0	0.1	0.25	0.50	0.75	2.0
0	0	0	0	0	0	0
1	47	41	33	27	23	21
3	79	68	56	49	40	32
5	89	82	68	55	45	42
7.5	93	85	75	56	53	43
10	97	88	77	62	56	48

Determinar los parámetros cinéticos de la L-iLDH, K_s y V , así como el tipo de inhibición y la K_i del oxalato.

CRUCIBIOQ

Yolanda Saldaña Balmori

GLUCÓLISIS



HORIZONTALES

- 6 Molécula central de los carbohidratos, la hexocinasa le transfiere un grupo fosforilo.
- 7 Molécula que fosforilada, se interconvierte en gliceraldehído -3-fosfato.
- 12 Se produce por deshidratación de 2-fosfoglicerato, tiene un delta G de -14.8 kcal/mol, forma ATP.
- 13 Enzima irreversible que fosforila a la glucosa y se inhibe por glucosa-6-fosfato.
- 14 Por la acción de esta enzima se forma ATP a partir de 1,3-bisfosfoglicerato.
- 16 Opción de la glucólisis en la que por cada molécula de azúcar se obtienen dos de ATP.
- 17 Proveniente de los triacilglicerolos, en un buen porcentaje se convierte en glucosa.

- 18 Acarrea energía entre metabolitos.
- 19 Forma en la que se encuentran los metabolitos de la glucólisis a excepción de glucosa y piruvato.
- 24 Sistema por el cual se trasladan equivalentes reductores del citosol a la mitocondria.
- 25 Vía que al degradar glucosa genera ATP además de producir un cetoadido de tres carbonos.
- 26 El gliceraldehído-3-fosfato pasa a 1,3-bisfosfoglicerato por este mecanismo y el de oxidación.
- 27 Enzima que permite que una hexosa fosforilada de lugar a dos triosas fosforiladas.
- 28 Mecanismo en el que intervienen la hexocinasa, la fosfofructocinasa y la piruvatocinasa.
- 29 Número de moléculas de ATP que se requieren en la fase preparatoria de la glucólisis.
- 30 Producto de la glucólisis anaeróbica, pasa al hígado, alimentador de la gluconeogénesis.

- 31 Se produce en el paso de oxidación de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato.
- 32 Ácido inorgánico, su participación permite la formación de 1,3-bisfosfoglicerato.

VERTICALES

- 1 Mantiene la glucemia durante el ayuno prolongado y es acelerada por glucocorticoides.
- 2 Enzima con delta G positivo, su producto es el 2-fosfoglicerato.
- 3 Producto final de la glucólisis, en su obtención interviene una cinasa que da lugar a ATP.
- 4 En dos pasos de la glucólisis, se sintetiza a partir de metabolitos de alta energía.
- 5 Enzima que en condiciones aerobias oxida lactato.
- 8 Ruta degradativa que requiere la presencia de oxígeno.
- 9 Número de ATP que en la glucólisis aeróbica se produce por fosforilación oxidativa.
- 10 Enzima que se inhibe por niveles altos de ATP y es activada por fructosa 2,6-bisfosfato.
- 11 Tipo de enzima que convierte a la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato.
- 15 Mecanismo por el cual el piruvato en presencia de NADH forma lactato.
- 20 Cofactor imprescindible de la hexocinasa, forma un complejo con el ATP.
- 21 Presente en el parénquima hepático, con ATP fosforila a la glucosa, no se inhibe por glucosa-6-fosfato.
- 22 Metabolito del ciclo de Krebs, inhibidor de la fosfofructocinasa.
- 23 Órgano en donde por la acción de la glucosa-6-fosfatasa se produce glucosa libre.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

RESPUESTAS:

El gráfico Lineweaver-Burk o de dobles recíprocos, es la forma más utilizada para obtener los parámetros cinéticos, así como los diferentes tipos de inhibición. Este gráfico se basa en un re-arreglo de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v/V = [S] / K_s + [S]$$

para formar una ecuación de forma lineal cuando invertimos los componentes de la ecuación y multiplicamos la ecuación por V :

$$1/v = (K_s / V) * (1 / [S]) + (1 / V)$$

donde V es la velocidad máxima, $[S]$ la concentración del sustrato y K_s la constante de disociación del complejo enzima-sustrato.

Así, la gráfica de dobles recíprocos entre el L-lactato y los valores de velocidad inicial a las diversas concentraciones de oxalato (Fig. 1, gráfica superior) muestra que las líneas que unen los puntos para cada concentración de inhibidor se interceptan en el segundo cuadrante, característica de las inhibiciones de tipo mixto, que como su nombre lo indica, afectan tanto a la K_s como a la V .

De este gráfico se puede calcular K_s y V a partir

de las ordenadas a las abscisas y al origen respectivamente, en ausencia de oxalato. En este caso la K_s de la L-iLDH por L-lactato es de 1.4 mM y la $V = 115$ nmol/min/mg prot.

La ecuación que explica una inhibición de tipo mixto es [1]:

$$v = [S] * V' / K_s' + [S]$$

donde

$$K_s' = K_s [(1+(I/K_i)) / (1+(I/(\alpha K_i)))] \text{ y}$$

$$V' = V / [1+(I/(\alpha K_i))]$$

I es la concentración del inhibidor y α es el factor que indica el número de veces que se ve afectada la K_s por la unión del inhibidor a la enzima. En este caso $\alpha > 1$.

De la ecuación anterior podemos observar que la K_s y V se encuentran afectadas por la concentración del inhibidor y por el factor α .

Entonces, si regraficamos los valores aparentes de $1/V$ (ordenadas al origen) y de K_s/V (pendientes) contra cada una de las concentraciones de oxalato, podemos obtener los valores de K_i y de α (Fig. 1, gráfica inferior). De esta forma, determinamos que la K_i para el oxalato fue de 0.3 mM y el factor α fue de 3.6.

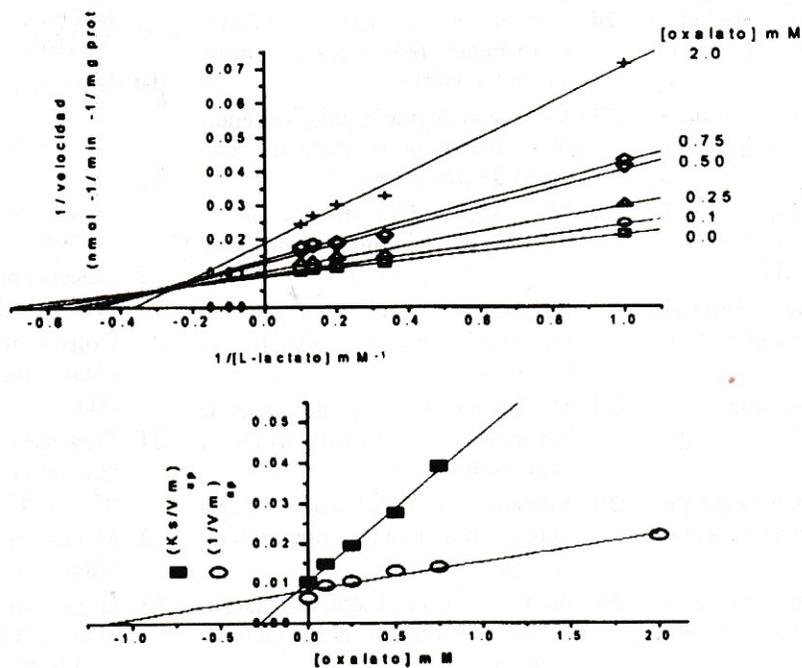


Figura 1.

Aunque el gráfico de dobles recíprocos es el más utilizado no es recomendable, pues conlleva una falsa impresión del error experimental: A valores bajos de velocidad inicial, errores pequeños en velocidad conducen a una gran dispersión de $1/V$; a valores altos de velocidad inicial, errores significativos en v_0 se traducen en una baja dispersión de $1/V$ [2]. Otra forma de obtener los parámetros cinéticos y el tipo de inhibición de una forma más confiable es editando la ecuación en un programa de cómputo y realizar el ajuste global no-lineal de todos los datos (Fig. 2). De esta manera, cada punto experimental tiene el mismo peso específico en la dispersión del ajuste. Los valores del ajuste no lineal para una inhibición de tipo mixto fueron: $K_s = 1.21$ mM, $K_i = 0.32$ mM, $\alpha = 3.97$ y $V = 108$ nmol/min/mg prot., valores que son muy similares a los encontrados por regresión lineal o de dobles recíprocos.

Estos resultados indican que el oxalato inhibe a la L-iLDH de *E. gracilis* con la misma potencia que a la de bacterias. Esta enzima sólo se ha localizado en mitocondrias de tripanosomátidos y euglenoides, que son dos grupos de eucariontes más primitivos que contiene organelos. Como la enzima de bacteria también es membranal y unida a la cadena respiratoria, estos resultados sugieren un posible origen común.

REFERENCIAS

1. Segel IH. Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York, 1975 Cap 11B pp 927-935.
2. Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. Portland Press, London. 1995.

Ricardo Jasso Chávez y Rafael Moreno Sánchez

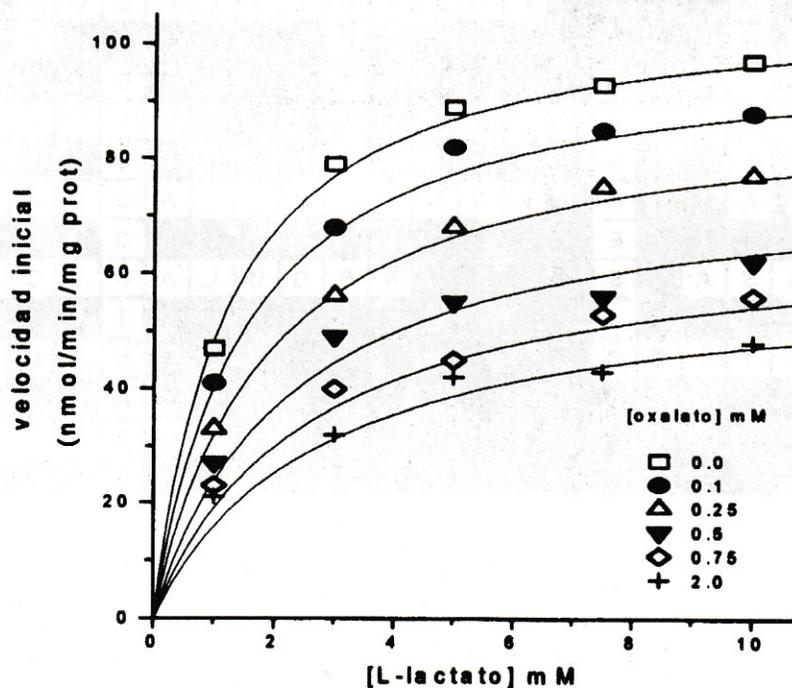
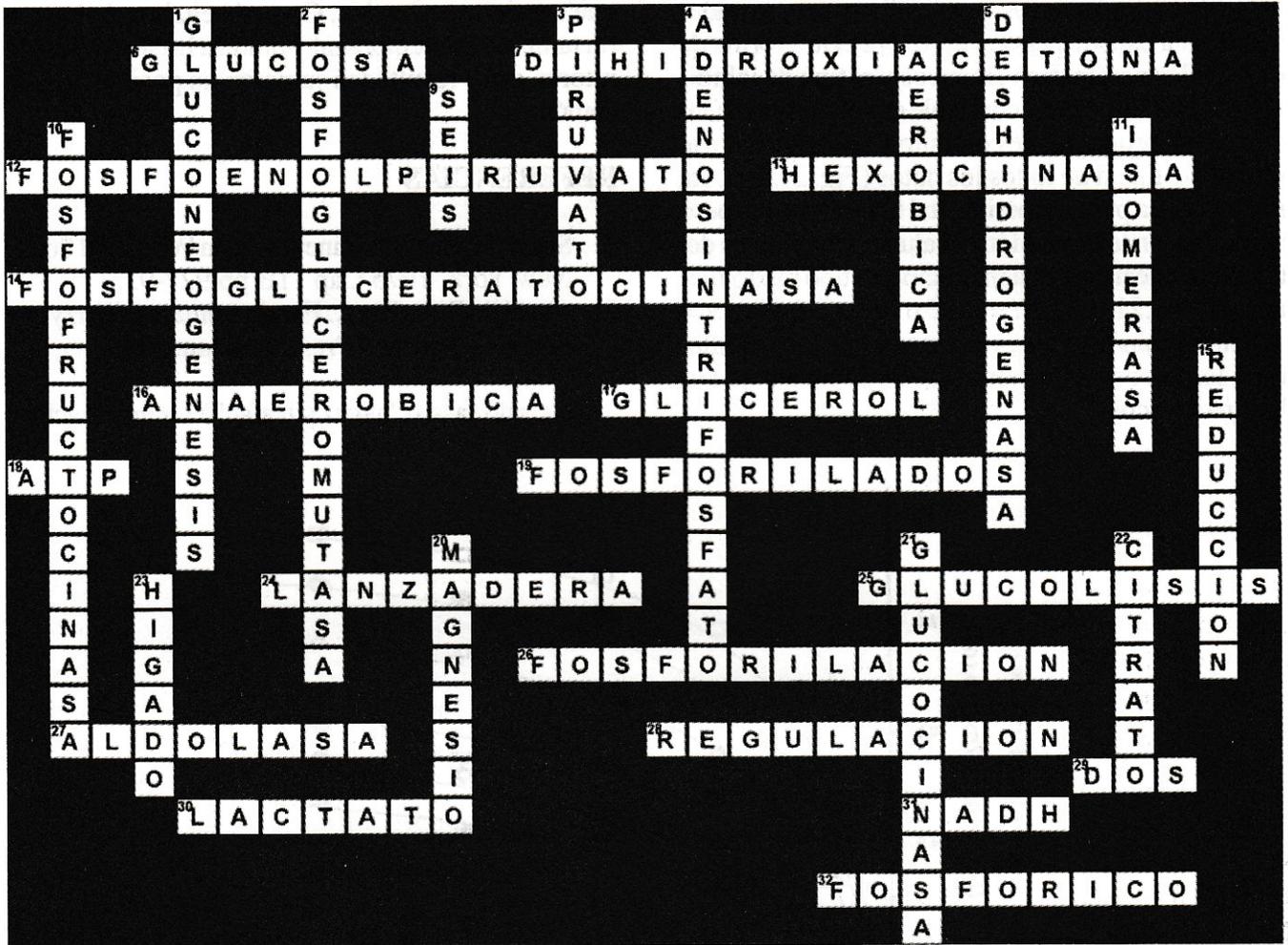


Figura 2.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ

GLUCÓLISIS



CONVOCATORIA

REGISTRO DE CANDIDATOS PARA OCUPAR LA PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C., DURANTE EL BIENIO 2002-2004

Con base en el artículo noveno de los Estatutos de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., el Consejo Directivo de la Asociación convoca a sus Asociados a postular Candidatos para ocupar la Presidencia de la Asociación durante el bienio 2002-2004, a partir de septiembre de 2002.

Los Asociados Numerarios deberán postular por escrito a sus Candidatos y cada Candidato postulado deberá entregar la siguiente documentación:

- Consentimiento por escrito para ser postulado.
- Proyecto de trabajo para dos años en caso de ser electo.
- Curriculum vitae.

Las cartas de postulación de los Asociados y la documentación de cada Candidato deberán ser entregadas a la Sra. Marivel Rojas García, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, antes del lunes 15 de julio de 2002. Los documentos requeridos podrán ser entregados personalmente o enviados por correo postal. El envío de la documentación por medios electrónicos (fax o correo electrónico) sólo tendrá validez hasta recibir los documentos originales.

Con base en el artículo décimo segundo de nuestros Estatutos, el próximo Presidente será elegido de la lista de Candidatos generada por el Consejo Directivo de la Asociación. La elección del nuevo Presidente se llevará a cabo durante la reunión de negocios del X Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., programada para octubre de 2002.

Ningún candidato podrá ser registrado después del 15 de julio de 2002, después de lo cual el Consejo Directivo analizará todas las propuestas para generar una lista de Candidatos elegibles, misma que presentará durante la sesión regular de negocios de la Asociación, que se realizará en octubre durante el X Congreso.

Entrega de documentos:

Sra. Marivel Rojas García.
Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina, UNAM.
Apartado Postal 70-281,
México, D.F., 04510,
MÉXICO.
Correo electrónico: beb@bq.unam.mx
Tel.: 5623-2170, Fax: 5616-2419

ÍNDICE GENERAL DEL CUARTO QUINQUENIO DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES DE EDITORIALES

- Calderón Salinas J V. (1997). LA MOTIVACIÓN ACADÉMICA EN EL ESTUDIANTE DE POSGRADO. *16(4)*: 125-127.
- Calderón Salinas J V. (1998). LA ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA EN HUMANOS. *17(3)*: 101-104.
- Calderón Salinas J V. (2000). A LA MEMORIA DE LA SEÑORA ELISA MORA. *19(4)*: 202-203.
- Calderón Salinas J V y Saldaña Balmori Y. (2001). VIGÉSIMO ANIVERSARIO. *20(4)*: 204-205.
- Calderón Salinas J V y Zentella Dehesa A. (1999). SE INICIAN Y SE REINICIAN SECCIONES EN EL BEB. *18(2)*: 51-52.
- Comité Editorial del BEB. El (1998). EL BEB Y EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM. *17(1)*: 1-2.
- Chávez Cossío E y Zentella Dehesa A. (2000). SE ESTABLECE UN NUEVO PROGRAMA DE VINCULACIÓN ENTRE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA. *19(3)*: 136-137.
- Juárez Oropeza M A. (2001). RETOS Y PERSPECTIVAS PARA LA ACTUAL PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C. *20(1)*: 4-5.
- Larralde C. (1998). LA NUEVA UNIVERSIDAD. *17(4)*: 147.
- León Cázares J M y Flores Rodríguez M T E. (1998). ¿ANTICIENCIA? *17(2)*: 47-48.
- Moreno Sánchez R. (2001). LA BIOENERGÉTICA DEL SIGLO XXI. *20(2)*: 70-71.
- Pérez Montfort R y Zentella Dehesa A. (2000). PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE REVISIONES DEL BEB EN LA PÁGINA ELECTRÓNICA DE LA SMB: COLABORACIÓN ENTRE DOS ASOCIACIONES PREOCUPADAS POR APOYAR LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA. *19(1)*: 4-8.
- Reyes Méndez J J. (1999). HACIA LA SOCIEDAD DEL APRENDIZAJE. *18(3)*: 95-97.
- Reyes Méndez J J. (2001). LA EDUCACIÓN CIENTÍFICA Y LA CONTROVERSIA SOBRE EL SIDA. EL PELIGRO DE LA ANTICIENCIA. *20(3)*: 132-136.
- Sánchez Esquivel S. (1997). LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS. *16(1)*: 3-4.
- Zentella Dehesa A. (1997). EL DR. JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES: EDITOR EN JEFE DEL BEB DE 1993 A 1996. *16(2)*: 37-38.
- Zentella Dehesa A y Calderón Salinas J V. (1997). LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA CUMPLE 40 AÑOS. *16(3)*: 83-85.
- Zentella Dehesa A y Mas Oliva J. (1997). XL ANIVERSARIO DE BIOQUÍMICA EN LAS AULAS Y EN LOS LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA CIUDAD UNIVERSITARIA DE LA UNAM. *16(Commemorativo)*: 4-5.
- Zentella Dehesa A y Calderón Salinas J V. (1999). INTEGRACIÓN DE NUEVOS MIEMBROS AL CONSEJO EDITORIAL DEL BEB. *18(1)*: 3-4.

Zentella Dehesa A y Calderón Salinas J V. (1999). LA REVISIÓN DE MANUSCRITOS POR INVESTIGADORES CON GRAN EXPERIENCIA EN EL TEMA. LA REVISIÓN: LA BASE DE UN BUEN TRABAJO EDITORIAL Y LA BÚSQUEDA DE UNA REVISTA CADA VEZ MÁS SÓLIDA. *18(4)*: 140-141.

Zentella Dehesa A. (2000). CAMBIO Y CONTINUIDAD. *19(2)*: 76-77.

^ AUTORES DE ARTÍCULOS

Alcántara Hernández R. (1998). AP-1, UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CLÁSICO. *17(3)*: 123-129.

Alcántara Hernández R. (2000). FOSFATASAS DE PROTEÍNAS: MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN. *19(3)*: 164-173.

Arredondo Peter R. (1997). FUNCIONES ALTERNATIVAS DE LAS HEMOGLOBINAS. *16(2)*: 39-46.

Azuaje R A, González I y Sánchez S. (1997). INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO, NITRÓGENO Y FOSFATOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS. *16(1)*: 11-16.

Barboza Corona J E e Ibarra J E. (1998). PROTEÍNAS INSECTICIDAS DE *Bacillus thuringiensis*. *17(1)*: 3-10.

Becerril Flores M A. (1999). LA CLONALIDAD DE *Trypanosoma cruzi* Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. *18(2)*: 60-65.

Benítez R y Rojas J O. (1997). BIOSÍNTESIS DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS. *16(1)*: 5-10.

Boffill Cárdenas M. (2000). LOS FLAVONOIDES, ANTIOXIDANTES NATURALES. *19(2)*: 95-100.

Brambila Colombres E M y Lozano Zaráin P. (1999). METALOTIONEINAS, BIOQUÍMICA Y FUNCIONES PROPUESTAS. *18(1)*: 21-27.

Broche Valle F, Céspedes Miranda E M y García Piñeiro J C. (1999). LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA. *18(3)*: 98-107.

Bustos Jaimes I, Montero Morán G M, Lara González S y Alvarez Añorve L I. (2001). ENZIMAS MÁS ALLÁ DE SU ÁMBITO FISIOLÓGICO: LIPASAS. *20(4)*: 234-240.

Calderón Salinas J V. (1997). ENTREVISTA CON EL DR. FÉLIX CÓRDOBA ALVA. *16(Conmemorativo)*: 33-42.

Castrejón Téllez V. (2000). EL PAPEL DEL POTASIO DURANTE LA ISQUEMIA *19(3)*: 158-163.

Cervantes C. (2000). MECANISMOS DE EXPULSIÓN DE METALES TÓXICOS EN BACTERIAS. *19(1)*: 24-31.

Cervantes C, Alvarez A H, Ramírez M I y Vargas E. (2000). EXPULSIÓN DE ARSENITO Y CROMATO EN BACTERIAS. *19(2)*: 103-109.

Céspedes Miranda E M, Arencibia Dávila R E, Broche Valle F y García Piñeiro J C. (1998). EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PATOGENIA DE LA ATEROSCLEROSIS. *17(1)*: 18-21.

Chávez Cárdenas M E. (1998). EL USO DE 1-ANILINO-8 NAFTALENOSULFONATO (ANS), PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INTERMEDIARIOS EN LA RUTA DE PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS GLOBULARES. *17(1)*: 11-17.

Covián R. (2000). CADENAS RESPIRATORIAS EN PROTISTAS. *19(4)*: 226-236.

Del Río Estrada C. (1997). DON JUAN ROCA OLIVÉ, FUNDADOR DE LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA EN MÉXICO. *16(Conmemorativo)*: 9-11.

Delgadillo Gutiérrez H J, Jarillo Soto E, Domínguez Echeverría P y Berruecos Villalobos L. (1999). LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA EN EL SISTEMA MODULAR: UNA EXPERIENCIA EN EL AULA. *18(3)*: 118-124.

- Delgado Coello B A y Mas Oliva J. (2000). FUNCIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA. *19(3)*: 138-145.
- Díez González T A. (2000). QUÍMICA ORGÁNICA: UN ENFOQUE BIOMÉDICO. *19(1)*: 36-42.
- Fernández Rivera Río L. (1997). LOS NUEVOS PROGRAMAS DE ENSEÑANZA BIOQUÍMICA ASISTIDA POR COMPUTADORA. *16(4)*: 148-151.
- Flores Herrera O y Martínez Montes F. (1998). ASPECTOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA 5'-NUCLEOTIDASAS. *17(2)*: 49-58.
- Flores Herrera O, Uribe A, Rendón J L, Pardo J P y Martínez F. (1999). ANÁLISIS TERMODINÁMICO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS. *18(2)*: 66-75.
- Flores Herrera O, Pardo J P y Martínez F. (2000). LA PARTICIPACIÓN DEL EFECTO HIDROFÓBICO Y DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO INTRAMOLECULARES EN LA ESTABILIDAD CONFORMACIONAL DE LAS PROTEÍNAS. *19(3)*: 146-157.
- Fragoso Contreras, G y López Colomé A M. (1997). LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE AMINOÁCIDOS EXCITADORES: CLASIFICACIÓN Y MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN. *16(3)*: 98-105.
- Gadea A y López Colomé A M. (2001). ASTROCITOS, ÓXIDO NÍTRICO Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. *20(4)*: 206-212.
- Gómez González E O y Zentella Dehesa A. (1998). A APOPTOSIS Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA. *17(3)*: 105-114.
- González Morán M G. (1997). REGULACIÓN EN LOS MECANISMOS DE CRECIMIENTO TISULAR. *16(2)*: 53-60.
- González Pedrajo B y Dreyfus G. (1999). MOTILIDAD, BIOGÉNESIS FLAGELAR Y QUIMIOTAXIS BACTERIANA. *18(4)*: 142-152.
- Guzmán García J. (1997). RELATORÍA DE EVENTOS EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM. LA VISIÓN DEL AUTOR. *16(Conmemorativo)*: 43-48.
- Higashida Guerrero C y Gutiérrez Venegas G. (1999). LIPOPOLISACÁRIDOS: EXTRAORDINARIAS MOLÉCULAS ACTIVADORAS DE SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN CELULAR. *18(1)*: 28-35.
- Huerta Saquero A, Calderón J, Du Pont G y Durán S. (1998). LOS CICLOS FÚTILES Y LA SOBREPDUCCIÓN DE METABOLITOS BAJO LA PERSPECTIVA DEL CONTROL METABÓLICO. *17(4)*: 157-165.
- Jasso Chávez R, Torres Márquez M E y Moreno Sánchez R. (2001). LACTATO DESHIDROGENASAS ACOPLADAS A LAS CADENAS RESPIRATORIAS. *20(1)*: 39-47.
- Lara González S y Montero Morán G. (2001). FOSFOLIPASA C ESPECÍFICA DE FOSFOINOSÍTIDOS, ESTRUCTURA Y PAPEL EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES. *20(4)*: 241-253.
- Lastra M D, García O F, Castellanos N, Ortega R y O M. (2000). LA ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM, A 10 AÑOS DE SU NACIMIENTO. *19(4)*: 219-225.
- León Cázares J M y Flores Rodríguez M T E. (1998). LAS TEORÍAS SOBRE LAS CAUSAS DEL ENVEJECIMIENTO. *17(2)*: 59-68.
- Lira Ruan K, Aréchaga Ocampo E, Ramírez Yáñez M, Sánchez Sánchez M y Arredondo Peter R. (2000). LAS HEMOGLOBINAS NO SIMBIÓTICAS DE LAS PLANTAS. *19(2)*: 87-94.
- Lledías F. (2000). PAPEL ESENCIAL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES. *19(4)*: 212-218.
- López Marure R, Sánchez Sánchez L, Chávez González M A y Weiss Steider B. (1998). PARTICIPA-

CIÓN DE LAS PROTEÍNAS SUPRESORAS DE TUMORES (RB Y P53) Y LOS COMPLEJOS CDK-CICLINA EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR. *17(2)*: 69-78.

Martínez F y Espinosa García M T, Maldonado G, García Pérez C, Navarrete J, Milán R, Flores Herrera O y Uribe A. (1998). EL TRANSPORTE DE COLESTEROL EN LO TEJIDOS ESTEROIDOGÉNICOS. *17(4)*: 148-156.

Mas Oliva J. (1997). PRINCIPIOS Y DESARROLLO DE LA BIOQUÍMICA EN MÉXICO. UNA VISIÓN DEL DR. JOSÉ LAGUNA GARCÍA. *16(Conmemorativo)*: 17-22.

Méndez R, Di Donna G y Sánchez S. (1997). AVANCES Y CONTRIBUCIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA BIOSÍNTESIS DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS. *16(1)*: 17-21.

Mendoza Cózatl D G, Avilés Rodríguez C, Hernández Navarro A, Loza Tavera H y Moreno Sánchez R. (2001). METABOLISMO DEL GLUTATIÓN EN MICROORGANISMOS Y PLANTAS. *20(4)*: 213-221.

Michán S. (2001). LAS RODOPSINAS: FOTORECEPTORES DESDE LAS ARQUEOBACTERIAS HASTA LOS VERTEBRADOS. *20(4)*: 269-277.

Montero Morán G, Alvarez Añorve L I y Lara González S. (2001). LA MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS ENZIMAS ¿UN ENFOQUE EXPERIMENTAL ANTICUADO? *20(1)*: 30-38.

Oliart R, Angulo J O y Torres Márquez M E. (1998). INSULINA: SU GEN Y SU MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR. *17(2)*: 79-85.

Ortega R, Luna C, Bustos J L y Montiel F. (1997). DUALIDAD FUNCIONAL DE LAS HISTONAS: PROTEÍNAS DE EMPACAMIENTO GENÓMICO Y DE CONTROL TRANSCRIPCIONAL. *16(4)*: 128-133.

Ortega R y Montiel F. (1999). TRANSPLANTE NUCLEAR Y CLONACIÓN DE ORGANISMOS SUPERIORES. *18(1)*: 11-20.

Ortuño Olea L y Durán Vargas S. (2000). LAS ASPARAGINASAS DE MICROORGANISMOS Y SU USO CLÍNICO. *19(1)*: 9-15.

Pacheco Moisés F, Bravo Peralta M C y García Trejo J J. (2000). MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA F_0F_1 -ATPasa DE BACTERIAS. *19(4)*: 204-211.

Pardo J P, Martínez F y Guerra G. (2001). LA ATP SINTETASA. *20(2)*: 85-92.

Pardo J P, Martínez F, Velásquez I y Flores Herrera O. (2001). EL COMPLEJO I DE LA CADENA RESPIRATORIA Y LOS FACTORES QUE DETERMINAN LA VELOCIDAD DE LA TRANSFERENCIA DE LOS ELECTRONES. *20(2)*: 93-102.

Pardo J P, Martínez F, Guerra G y Velásquez I. (2001). EL COMPLEJO II: LA SUCCINATO DESHIDROGENASA DE LA CADENA RESPIRATORIA. *20(2)*: 103-107.

Pardo J P, Martínez F, Rendón Gómez J L y Flores Herrera O. (2001). EL COMPLEJO III: EL CITO-CROMO BC_1 . *20(3)*: 137-143.

Pardo J P, Martínez F, Mendoza G y Velásquez I. (2001). EL COMPLEJO IV O CITO-CROMO C OXIDASA DE LA CADENA RESPIRATORIA. *20(3)*: 144-151.

Parés Hipólito J y Calderón Salinas J V. (1997). ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR PRIONES. *16(3)*: 92-97.

Peinado H y Liras A. (2000). ESTUDIO COMPUTARIZADO DE LA PREDICCIÓN ESTRUCTURAL COMPARADA DE LAS CARNITINA PALMITOILTRANSFERASAS. *19(1)*: 16-23.

Pereira Roche N. (2001). EL ENDOTELIO VASCULAR Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL. *20(2)*: 79-84.

Pérez León J A y Salceda Sacanelles R. (1997). LA NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS. *16(4)*: 140-147.

- Ponce Leoporto C A, Florido Segoviano A, Borrego López C y Calderón Salinas J V. (1997). A 35 AÑOS DEL DESCUBRIMIENTO DE LAS AFLATOXINAS. *16(2)*: 47-52.
- Porcel Aranibar R y Becker Fausel I. (2001). EL EOSINÓFILO: CÉLULA EFECTORA EN ENFERMEDADES PARASITARIAS. *20(1)*: 48-53.
- Quijano Massiel del R y Pratz Pérez P. (2001). MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN PARA EL IFM GAMMA. *20(3)*: 152-157.
- Rangel Serrano A. (1999). FUNCIÓN Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS PROTEÍNAS G. *18(2)*: 53-59.
- Raya Pérez J C. (2000). LA FOTOSÍNTESIS, LAS REACCIONES LUMINOSAS. *19(2)*: 78-86.
- Raya Perez J C. (2001). LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES Y LA COMPLEJIDAD DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS. *20(2)*: 72-78.
- Raya Pérez J C. (2001). LOS ESTOMAS: APERTURA Y CIERRE Y CANALES IÓNICOS. *20(3)*: 158-166.
- Recillas Targa F. (2001). LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA Y SU RELACIÓN CON LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA. *20(1)*: 6-18.
- Rendón Huerta E P y Robles Flores M. (2001). ACTIVACIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CINASAS C: AVANCES Y PERSPECTIVAS. *20(1)*: 19-29.
- Reyes Méndez J J. (1998). APROXIMACIÓN A LOS FRACTALES Y LA TEORÍA DEL CAOS. LA FISIOLOGÍA HUMANA Y LA EVOLUCIÓN CELULAR. *17(1)*: 23-30.
- Reyes Méndez J J. (1999). LA CIENCIA A LA ZAGA DE LA NATURALEZA. *18(4)*: 174-179.
- Reyes Reyes M, Rosales C, Hernández R y López Villaseñor I. (2001). MECANISMOS QUE REGULAN LA DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE ACTINA. *20(3)*: 175-184.
- Reynoso Ducoing O A, Cruz Rivera M Y, Ambrosio J y Flisser A. (2000). LAS ACTINAS Y SU ESTUDIO EN PARÁSITOS. *19(1)*: 32-35.
- Rodríguez Campos E M y Hamabata A. (2001). GENERALIDADES SOBRE LA BIOQUÍMICA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS. *20(4)*: 254-263.
- Rodríguez R, Ruiz B y Sánchez S. (1998). LOS CAROTENOIDES EN LA SALUD. *17(3)*: 115-121.
- Salaiza Suazo N L y Becker Fauser I. (2001). PAPEL DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS CD8+ EN INFECCIONES POR PROTOZOARIOS INTRACELULARES. *20(4)*: 264-268.
- Saldaña Balmori Y. (1997). LA DIFUSIÓN DE LA BIOQUÍMICA. *16(Commemorativo)*: 12-16.
- Sánchez Linares L y Gavilanes Ruiz M. (1999). LA ELOGACIÓN CELULAR COMO UN FENÓMENO ASOCIADO A LA GERMINACIÓN EN LAS SEMILLAS. *18(1)*: 5-10.
- Santana C y García Carrancá A. (1997). LOS GENES *Ras*, EL CICLO CELULAR Y EL DESARROLLO DE TUMORES. *16(3)*: 86-91.
- Serna Hernández O, Serna Vargas C y Calderón Salinas J V. (1997). EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO EN PACIENTES CON ÓRGANOS TRANSPLANTADOS. *16(4)*: 134-139.
- Silva G y Calderón Salinas J V. (1997). LA MEMORIA INMUNE. *16(3)*: 106-112.
- Sotelo Mundo R R. (2001). ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA TIMIDILATO SINTETASA EN EL DISEÑO DE FÁRMACOS ANTICÁNCER. *20(2)*: 108-113.
- Torres Márquez M E, Franco R y Ochoa de la Paz L D. (2001). LA MAPK-p38, SU ESTRUCTURA, CINÉTICA Y FUNCIÓN. *20(3)*: 167-174.
- Valencia Pérez A y Morán Andrade J. (2001). PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA MUERTE APOPTÓTICA NEURONAL EN EL DESARROLLO Y EN ALGUNAS PATOLOGÍAS. *20(4)*: 222-233.

Vásquez Galván C y Carvajal K. (1997). MODELOS EXPERIMENTALES FISIOLÓGICOS PARA ESTUDIOS BIOQUÍMICOS: EL CORAZÓN AISLADO Y PERFUNDIDO. *16(2)*: 61-66.

Vega Hernández A y Zaráin Herzberg A. (1999). FACTORES TRANSCRIPCIONALES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN MÚSCULO. *18(3)*: 108-114.

Ventura Gallegos JL, Gómez González E O y Zentella Dehesa A. (1999). CASPASAS: UNA CASCADA DE PROTEASAS IMPLICADAS EN LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS. *18(4)*: 153-165.

Vivero JM y Calderón Salinas J V. (1998). LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LA INFECCIÓN VIRAL. *17(4)*: 172-177.

Zamudio Maya M. (1998). FISIOLÓGIA Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DURANTE LA FASE ESTACIONARIA DE CRECIMIENTO EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS. *17(4)*: 166-171.

Zazueta Mendizábal A C. (1999). TRANSPORTADORES DE CATIONES EN MITOCONDRIAS DE MAMÍFEROS. *18(4)*: 166-173.

Zentella de Piña M, Pimentel Velásquez L, Vázquez Meza H, Piña Zentella G y Riveros Rosas H. (2000). NUEVAS ACCIONES DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES. *19(3)*: 174-181.

Zentella Dehesa A. (1997). ENTREVISTA CON EL DR. RAÚL ONDARZA VIDAURRETA. *16(Commemorativo)*: 23-27.

Zentella Dehesa A. (1997). ENTREVISTA CON EL DR. CARLOS DEL RÍO ESTRADA. *16(Commemorativo)*: 28-32.

Zentella Dehesa A. (1997). ENTREVISTA CON EL DR. GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL. *16(Commemorativo)*: 49-53.

AUTORES DE OTRAS COMUNICACIONES

Alcázar Montenegro H. (1997) INVESTIGACIÓN BÁSICA CONTRA TECNOLOGÍA. *16(3)*: 113-114.

Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. (1998) VI CONGRESO. *17(1)*: 35-36.

Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. (1998) VI CONGRESO. *17(2)*: 88.

Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. (1998) FALLECIÓ EL DR. JOAQUÍN CRAVIOTO MUÑOZ. *17(2)*: 87.

Calderón Salinas J V. (1997) LA TEORÍA DE LA EVOLUCIÓN NO ES UN DECRETO. *16(1)*: 22-25.

Calderón Salinas J V. (1999) UN AGRADECIMIENTO A LA SRA. ELISA MORA DE SALLES. *18(1)*: 38.

Carvajal Sandoval G. (1997) COMENTARIOS DE UN ARTÍCULO. *16(3)*: 115.

Chávez Cosío E. (1999) A LA MEMORIA DE LA DOCTORA ADELA CUÉLLAR DE HERNÁNDEZ. *18(4)*: 182.

Covián R y Moreno Sánchez R. (2000) PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. *19(1)*: 52 y 54.

Covián R y Moreno Sánchez R. (2001) EL MOVIMIENTO DE PROTONES A TRAVÉS DEL COMPLEJO bc₁. ¿BOMBEO O TRANSLOCACIÓN NETA? *20(3)*: 186-187.

Del Campo González J G. (1999) HAY QUE DARLE MAYOR CRÉDITO AL ORIGEN EXTRATERRESTRE DE LA VIDA. *18(2)*: 81.

Florido Segoviano A y Calderón Salinas J V. (1997) UN EDITOR EN JEFE LLAMADO DR. LEÓN. *16(2)*: 73.

Gavilanes Ruiz M. (1997) RECONOCIMIENTO A LA DOCTORA ESTELA SÁNCHEZ. *16(4)*: 158.

GARCÍA SÁINZ AL RECIBIR EL PREMIO NACIONAL DE CIENCIAS Y ARTES. Discurso (1998) DEL DR. ADOLFO, (1997) *17(1)*: 33-34.

Hernández Ángeles A. (1999) LA FALTA DE MOTIVACIÓN COMO MECANISMO DE SELECCIÓN NATURAL EN EL PROCESO DE EVO-

LUCIÓN DENTRO DE LOS PROGRAMAS DE POSGRADO. *18(1)*: 39-40.

Hernández Pech X E. (1997) MICROORGANISMOS: ¿ACASO PLURICELULARES TAMBIÉN? *16(2)*: 67-68.

Juárez Oropeza M A. (1999) DEL BUEN DECIR. *18(2)*: 76-77.

Juárez O y Moreno Sánchez R. (2001) PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. ENZIMAS ALOSTÉRICAS. *20(1)*: 54 y 56.

Laclette J P y Chimal Monroy J. (1999) LINO DÍAZ DE LEÓN OBITUARIO. *18(4)*: 180-182.

León Cázares J M. (1997) RICARDO TAPIA IBARGÜENGOITIA: INVESTIGADOR EMÉRITO DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. *16(2)*: 71-72.

León Cázares J M. (1997) VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ: INVESTIGADORA EMÉRITA DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. *16(2)*: 69-70.

León Cázares J M. (1998) SOBRE LOS PUNTOS DE LAS ABREVIATURAS. *17(3)*: 130-131.

López Bojórquez L N. (1999) LAS BASES MOLECULARES DE LA PERCEPCIÓN DEL PICANTE O LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE LA CAPSAICINA. *18(3)*: 125-127.

Mas Oliva J. (1998) ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR A PROTEÍNAS MODIFICADAS, RECEPTOR "BASURERO" O "scavenger". *17(1)*: 31-32.

Matrajit Arbetman G. (1997) LOS TRABAJOS DE MILLER Y FOX. SU INFLUENCIA SOBRE LAS IDEAS ACERCA DEL ORIGEN DE LA VIDA EN LA TIERRA. *16(1)*: 27-28.

Milán Chávez R. (1998) INQUIETUD SOBRE LA PUNTUACIÓN EN LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL BEB. *17(3)*: 130.

Morales López S, Juárez Oropeza M A, Pardo Vázquez J P y Martínez Montes F. (1997) INFORME DEL XXIV TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA. *16(4)*: 153-156.

Morales López S, Juárez Oropeza M A, Pardo Vázquez J P y Martínez Montes F. (1998) INFORME DEL XXV TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA. *17(4)*: 181-184.

Morales López S, Juárez Oropeza M A, Pardo Vázquez J P y Martínez Montes F. (2000) INFORME DEL XXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA. *19(1)*: 47-50.

Moreno Sánchez R. (1999) PROBLEMA BIOQUÍMICO. BIOENERGÉTICA. *18(2)*: 79.

Moreno Sánchez R. (1999) CÁTEDRA PATRI-MONIAL DE EXCELENCIA. NIVEL II. *18(4)*: 183-184.

Moreno Sánchez R y Castillo A. (1999) PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. *18(4)*: 186 y 189.

Jasso Chávez R y Moreno Sánchez R. (2001) PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. INHIBICIÓN DE TIPO MIXTO. *20(4)*: 278, 280 y 281.

Ortiz Jiménez M A. (1999) LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN LAS CIENCIAS BIOMÉDICAS. *18(2)*: 78-79.

Pacheco Moisés F y Moreno Sánchez R. (2001) PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. ACTIVACIÓN NO ESENCIAL. *20(2)*: 114-116.

Pardo J P, Martínez F, Rendón J L y Flores O. (2001) SOBRE EL BOMBEO DE PROTONES POR EL CITOCROMO bc₁. *20(3)*: 184 y 185.

Rodríguez Enríquez S y Moreno Sánchez R. (1999) PROBLEMA BIOQUÍMICO BIOENERGÉTICA. *18(3)*: 128.

Rodríguez Enríquez S y Moreno Sánchez R. (2001) PROBLEMA BIOQUÍMICO. CONTROL METABÓLICO. *20(3)*: 188 y 190.

- Rodríguez Enríquez S y Moreno Sánchez R. (2000) PROBLEMA BIOQUÍMICO. CONTROL METABOLICO. *19(4)*: 237, 239 y 240.
- Rojas del Castillo E. (1999) COMENTARIOS SOBRE LIBROS DE RECIENTE PUBLICACIÓN. *18(4)*: 185.
- Salceda Sacanalles R. (1998) HERMINIA PASANTES MORALES ORDÓNEZ: INVESTIGADORA EMÉRITA DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. *17(2)*: 86.
- Saldaña Balmori Y. (1998) EL DR. ENRIQUE PIÑA GARZA ES DESIGNADO PROFESOR EMÉRITO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. *17(4)*: 178-179.
- Saldaña Balmori Y. (1999) CRUCIBIOQ. ÁCIDOS, BASES Y SALES. *18(3)*: 129 y 130.
- Saldaña Balmori Y. (1999) CRUCIBIOQ. QUÍMICA DE PROTEÍNAS. *18(4)*: 187 y 189.
- Saldaña Balmori Y. (2000) CRUCIBIOQ. ENZIMAS. *19(1)*: 53 y 55.
- Saldaña Balmori Y. (2000) CRUCIBIOQ. QUÍMICA DE CARBOHIDRATOS. *19(2)*: 113 y 116.
- Saldaña Balmori Y. (2000) CRUCIBIOQ. QUÍMICA DE LÍPIDOS. *19(3)*: 183 y 186.
- Saldaña Balmori Y. (2000) CRUCIBIOQ. VITAMINAS. *19(4)*: 238 y 241.
- Saldaña Balmori Y. (2001) CRUCIBIOQ. QUÍMICA DE NUCLEÓTICOS. *20(1)*: 55 y 57.
- Saldaña Balmori Y. (2001) CRUCIBIOQ. RADICALES LIBRES. *20(2)*: 115 y 119.
- Saldaña Balmori Y. (2001) CRUCIBIOQ. CICLO DE KREBS. *20(3)*: 189 y 191.
- Saldaña Balmori Y. (2001) CRUCIBIOQ. GLUCÓLISIS. *20(4)*: 279 y 282.
- Sánchez Esquivel S. (2000) COMENTARIOS SOBRE LIBROS DE RECIENTE PUBLICACIÓN VIDA, ORIGEN Y CAOS: PROPUESTA PARA NUEVOS ENFOQUES EN BIOLOGÍA. *19(1)*: 151.
- Varela Gómez M y Moreno Sánchez R. (2000) PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. *19(2)*: 112, 114 y 115.
- Varela Gómez M y Moreno Sánchez R. (2000) PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA. INACTIVACIÓN TÉRMICA. *19(3)*: 182, 184 y 185.
- Zavala Olalde J.C. (1997) UNA REFLEXIÓN NECESARIA. *16(1)*: 26.
- Zentella Dehesa A. (1997) COMENTARIOS SOBRE EL LIBRO: "SEMBLANZAS, LOS FUNDADORES DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA, 1957-1997". EDITADO POR EL DR. RAÚL ONDARZA VIDAURRETA. *16(4)*: 157.
- Zentella Dehesa A. (1997) ADOLFO GARCÍA SAINZ, PREMIO NACIONAL DE CIENCIAS Y ARTES 1997. *16(4)*: 159.
- Zentella Dehesa A. (1998) COMPATIBILIDAD EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR ENTRE NÚCLEO Y CITOPLASMA: UNA LIMITACIÓN EN LA CLONACIÓN DE MAMÍFEROS. *17(3)*: 132-134.
- Zentella Dehesa A. (1998) DR. ENRIQUE PIÑA GARZA, PROFESOR EMÉRITO DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y FUNDADOR DEL BEB Y DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA. *17(4)*: 180.
- Zentella Dehesa A. (1999) BIOLOGÍA FUNCIONAL DE LOS ANIMALES. COMENTARIO SOBRE EL LIBRO. *18(1)*: 36-37.
- Zentella Dehesa A. (1999) BIOLOGÍA MOLECULAR EN MEDICINA. COMENTARIO SOBRE EL LIBRO. *18(2)*: 82.
- Zentella Dehesa A. (2000) GÜNTER BLOBLE, PREMIO NOBEL 2000: LOS CÓDIGOS POSTALES DE LA CÉLULA Y EL MECANISMO

MOLECULAR QUE DETERMINA EL DESTINO SUBCELULAR DE CADA PROTEÍNA. *19(1)*: 43-46.

Zentella Dehesa A. (2000) COMENTARIOS SOBRE LIBROS DE RECIENTE PUBLICACIÓN. LAS CITOCINAS EN LA HEMATOPOYESIS Y SISTEMA INMUNOLÓGICO: MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES. *19(2)*: 110-111.

TÍTULOS DE EDITORIALES

¿ANTICIENCIA? León Cázares J M y Flores Rodríguez M T E. *17(2)*: 47-48. 1998.

BEB Y EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM. EL, Comité Editorial del BEB. *17(1)*: 1-2. 1998.

BIOENERGÉTICA DEL SIGLO XXI. LA, Moreno Sánchez R. *20(2)*: 70-71. 2001.

CAMBIO Y CONTINUIDAD. Zentella Dehesa A. *19(2)*: 76-77. 2000.

DR. JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES: EDITOR EN JEFE DEL BEB DE 1993 A 1996. EL, Zentella Dehesa A. *16(2)*: 37-38. 1997.

EDUCACIÓN CIENTÍFICA Y LA CONTROVERSIA SOBRE EL SIDA. EL PELIGRO DE LA ANTICIENCIA. LA, Reyes Méndez J J. *20(3)*: 132-136. 2001.

ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA EN HUMANOS. LA, Calderón Salinas J V. *17(3)*: 101-104. 1998.

HACIA LA SOCIEDAD DEL APRENDIZAJE. Reyes Méndez J J. *18(3)*: 95-97. 1999.

INTEGRACIÓN DE NUEVOS MIEMBROS AL CONSEJO EDITORIAL DEL BEB. Zentella Dehesa A y Calderón Salinas J V. *18(1)*: 3-4. 1999.

MEMORIA DE LA SEÑORA ELISA MORA. A LA, Calderón Salinas J V. *19(4)*: 202-203. 2000.

MOTIVACIÓN ACADÉMICA EN EL ESTUDIANTE DE POSGRADO. LA, Calderón Salinas J V. *16(4)*: 125-127. 1997.

NUEVA UNIVERSIDAD. LA, Larralde C. *17(4)*: 147. 1998.

PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE REVISIONES DEL BEB EN LA PÁGINA ELECTRÓNICA DE LA SMB: COLABORACIÓN ENTRE DOS ASOCIACIONES PREOCUPADAS POR APOYAR LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA. Pérez Montfort R y Zentella Dehesa A. *19(1)*: 4-8. 2000.

RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTI-BIÓTICOS β -LACTÁMICOS. LA, Sánchez Esquivel S. *16(1)*: 3-4. 1997.

RETOS Y PERSPECTIVAS PARA LA ACTUAL PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C. Juárez Oropeza M A. *20(1)*: 4-5. 2001.

REVISIÓN DE MANUSCRITOS POR INVESTIGADORES CON GRAN EXPERIENCIA EN EL TEMA. LA REVISIÓN: LA BASE DE UN BUEN TRABAJO EDITORIAL Y LA BÚSQUEDA DE UNA REVISTA CADA VEZ MÁS SÓLIDA. LA, Zentella Dehesa A y Calderón Salinas J V. *18(4)*: 140-141. 1999.

SE INICIAN Y SE REINICIAN SECCIONES EN EL BEB. Calderón Salinas J V y Zentella Dehesa A. *18(2)*: 51-52. 1999.

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA CUMPLE 40 AÑOS. LA, Zentella Dehesa A y Calderón Salinas J V. *16(3)*: 83-85. 1997.

VIGÉSIMO ANIVERSARIO. Calderón Salinas J V y Saldaña Balmori Y. *20(4)*: 204-205.

VINCULACIÓN ENTRE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA. SE ESTABLECE UN NUEVO PROGRAMA DE, Chávez Cossío E y Zentella Dehesa A. *19(3)*: 136-137. 2000.

XL ANIVERSARIO DE BIOQUÍMICA EN LAS AULAS Y EN LOS LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA CIUDAD UNIVERSITARIA DE LA UNAM. Zentella Dehesa A y Mas Oliva J. *16*(Conmemorativo): 4-5. 1997.

TÍTULOS DE ARTÍCULOS

A 35 AÑOS DEL DESCUBRIMIENTO DE LAS AFLATOXINAS. Ponce Leoport C A, Florido Segoviano A, Borrego López C y Calderón Salinas J V. *16*(2): 47-52. 1997.

ACTINAS Y SU ESTUDIO EN PARÁSITOS. LAS, Reynoso Ducoing O A, Cruz Rivera M Y, Ambrosio J y Flisser A. *19*(1): 32-35. 2000.

ACTIVACIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CINASAS C: AVANCES Y PERSPECTIVAS. Rendón Huerta E P y Robles Flores M. *20*(1): 19-29. 2001.

ANÁLISIS TERMODINÁMICO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS. Flores Herrera O, Uribe A, Rendón J L, Pardo J P y Martínez F. *18*(2): 66-75. 1999.

AP-1, UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CLÁSICO. Alcántara Hernández R. *17*(3): 123-129. 1998.

APOPTOSIS Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA. Gómez González E O y Zentella Dehesa A. *17*(3): 105-114. 1998.

APROXIMACIÓN A LOS FRACTALES Y LA TEORÍA DEL CAOS. LA FISIOLÓGIA HUMANA Y LA EVOLUCIÓN CELULAR. Reyes Méndez J J. *17*(1): 23-30. 1998.

ASPARAGINASAS DE MICROORGANISMOS Y SU USO CLÍNICO. LAS, Ortuño Olea L y Durán Vargas S. *19*(1): 9-15. 2000.

ASPECTOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA 5'-NUCLEOTIDASAS. Flores Herrera O y Martínez Montes F. *17*(2): 49-58. 1998.

ASTROCITOS, ÓXIDO NÍTRICO Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. Gadea A y López Colomé A M. *20*(4): 206-212.

ATP SINTETASA. LA, Pardo J P, Martínez F y Guerra G. *20*(2): 85-92. 2001.

AVANCES Y CONTRIBUCIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA BIOSÍNTESIS DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS. Méndez R, Di Donna G y Sánchez S. *16*(1): 17-21. 1997.

BIOSÍNTESIS DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS. Benítez R y Rojas J O. *16*(1): 5-10. 1997.

CADENAS RESPIRATORIAS EN PROTISTAS. Covián R. *19*(4): 226-236. 2000.

CAROTENOIDES EN LA SALUD. LOS, Rodríguez R, Ruiz B y Sánchez S. *17*(3): 115-121. 1998.

CARVAJAL SANDOVAL. ENTREVISTA CON EL DR. GUILLERMO, Zentella Dehesa A. *16*(Conmemorativo): 49-53. 1997.

CASPASAS: UNA CASCADA DE PROTEASAS IMPLICADAS EN LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS. Ventura Gallegos J L, Gómez González E O y Zentella Dehesa A. *18*(4): 153-165. 1999.

CICLOS FÚTILES Y LA SOBREPDUCCIÓN DE METABOLITOS BAJO LA PERSPECTIVA DEL CONTROL METABÓLICO. LOS, Huerta Saquero A, Calderón J, Du Pont G y Durán S. *17*(4): 157-165. 1998.

CIENCIA A LA ZAGA DE LA NATURALEZA. LA, Reyes Méndez J J. *18*(4): 174-179. 1999.

CITOMEGALOVIRUS HUMANO EN PACIENTES CON ÓRGANOS TRANSPLANTADOS. EL, Serna Hernández O, Serna Vargas C y Calderón Salinas J V. *16*(4): 134-139. 1997

CLONALIDAD DE *Trypanosoma cruzi* Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. LA, Becerril Flores M A. *18*(2): 60-65. 1999.

COMPLEJO I DE LA CADENA RESPIRATORIA Y LOS FACTORES QUE DETERMINAN LA VELOCIDAD DE LA TRANSFERENCIA DE LOS ELECTRONES. EL, Pardo J P, Martínez F, Velásquez I y Flores Herrera O. 20(2): 93-102. 2001.

COMPLEJO II: LA SUCCINATO DESHIDROGENASA DE LA CADENA RESPIRATORIA. EL, Pardo J P, Martínez F, Guerra G y Velásquez I. 20(2): 103-107. 2001.

COMPLEJO III: EL CITOCROMO bc₁. EL Pardo J P, Martínez F, Rendón Gómez J L y Flores Herrera O. 20(3): 137-143. 2001

COMPLEJO IV O CITOCROMO C OXIDASA DE LA CADENA RESPIRATORIA. EL, Pardo J P, Martínez F, Mendoza G y Velásquez I. 20(3): 144-151. 2001.

CÓRDOBA ALVA. ENTREVISTA CON EL DR. FÉLIX, Calderón Salinas J V. 16(Conmemorativo): 33-42. 1997.

DEL RÍO ESTRADA. ENTREVISTA CON EL DR CARLOS, Zentella Dehesa A. 16(Conmemorativo): 28-32. 1997.

DIFUSIÓN DE LA BIOQUÍMICA. LA, Saldaña Balmori Y. 16(Conmemorativo): 12-16. 1997.

DUALIDAD FUNCIONAL DE LAS HISTONAS: PROTEÍNAS DE EMPACAMIENTO GENÓMICO Y DE CONTROL TRANSCRIPCIONAL. Ortega R, Luna C, Bustos J L y Montiel F. 16(4): 128-133. 1997.

ELOGACIÓN CELULAR COMO UN FENÓMENO ASOCIADO A LA GERMINACIÓN EN LAS SEMILLAS. LA, Sánchez Linares Luis y Gavilanes Ruiz M. 18(1): 5-10. 1999.

ENDOTELIO VASCULAR Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL. EL, Pereira Roche N. 20(2): 79-84. 2001.

ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR PRIONES. Parés Hipólito J y Calderón Salinas J V. 16(3): 92-97. 1997.

ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA EN EL SISTEMA MODULAR: UNA EXPERIENCIA EN EL AULA. LA, Delgadillo Gutiérrez H J, Jarillo Soto E, Domínguez Echeverría P y Berruecos Villalobos L. 18(3): 118-124. 1999.

ENZIMAS MÁS ALLÁ DE SU ÁMBITO FISIOLÓGICO: LIPASAS. Bustos Jaimes I, Montero Morán G, Lara González S y Alvarez Añorve L I. 20(4): 234-240. 2001.

EOSINÓFILO: CÉLULA EFECTORA EN ENFERMEDADES PARASITARIAS. EL, Porcel Aranibar R y Becker Fausel I. 20(1): 48-53. 2001.

ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM, A 10 AÑOS DE SU NACIMIENTO. LA, Lastra M D, García O F, Castellanos N, Ortega R y Oliva M. 19(4): 219-225. 2000.

ESTOMAS: APERTURA Y CIERRE Y CANALES IÓNICOS. LOS, Raya Pérez J C. 20(3): 158-166. 2001.

ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PATOGENIA DE LA ATROSCLEROSIS. EL, Céspedes Miranda E M, Arencibia Dávila R E, Broche Valle F y García Piñeiro J C. 17(1): 18-21. 1998.

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA Y SU RELACIÓN CON LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA. LA, Recillas Targa F. 20(1): 6-18. 2001

ESTUDIO COMPUTARIZADO DE LA PREDICCIÓN ESTRUCTURAL COMPARADA DE LAS CARNITINA PALMITOILTRANSFERASAS. Peinado H y Liras A. 19(1): 16-23. 2000.

ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA TIMIDILATO SINTETASA EN EL DISEÑO DE FÁRMACOS ANTICÁNCER. Sotelo Mundo R R. 20(2): 108-113. 2001.

EXPULSIÓN DE ARSENITO Y CROMATO EN BACTERIAS. Cervantes C, Alvarez A H, Ramírez M I y Vargas E. 19(2): 103-109. 2000.

- FACTORES TRANSCRIPCIONALES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN MÚSCULO. Vega Hernández A y Zaráin Herzberg A. *18(3)*: 108-114. 1999.
- FISIOLOGÍA Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DURANTE LA FASE ESTACIONARIA DE CRECIMIENTO EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS. Zamudio Maya M. *17(4)*: 166-171. 1998.
- FLAVONOIDES, ANTIOXIDANTES NATURALES. LOS, Boffill Cárdenas M. *19(2)*: 95-100. 2000.
- FOSFATASAS DE PROTEÍNAS: MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN. Alcántara Hernández R. *19(3)*: 164-173. 2000.
- FOSFOLIPASA C ESPECÍFICA DE FOSFOINOSÍTIDOS, ESTRUCTURA Y PAPEL EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES. Lara González S y Montero Morán G. *20(4)*: 241-253. 2001.
- FOTOSÍNTESIS, LAS REACCIONES LUMINOSAS. LA, Raya Pérez J C. *19(2)*: 78-86. 2000.
- FUNCIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA. Delgado Coello B A y Mas Oliva J. *19(3)*: 138-145. 2000.
- FUNCIÓN Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS PROTEÍNAS G. Rangel Serrano A. *18(2)*: 53-59. 1999.
- FUNCIÓNES ALTERNATIVAS DE LAS HEMOGLOBINAS. Arredondo Peter R. *16(2)*: 39-46. 1997.
- GENERALIDADES SOBRE LA BIOQUÍMICA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS. Rodríguez Campos E M y Hamabata A. *20(4)*: 254-263.
- GENES *Ras*, EL CICLO CELULAR Y EL DESARROLLO DE TUMORES. LOS, Santana C y García Carrancá A. *16(3)*: 86-91. 1997.
- HEMOGLOBINAS NO SIMBIÓTICAS DE LAS PLANTAS. LAS, Lira Ruan K, Aréchaga Ocampo E, Ramírez Yáñez M, Sánchez Sánchez M y Arredondo Peter R. *19(2)*: 87-94. 2000.
- INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO, NITRÓGENO Y FOSFATOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS. Azuaje R A, González I y Sánchez S. *16(1)*: 11-16. 1997.
- INSULINA: SU GEN Y SU MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR. Oliart R, Angulo J O y Torres Márquez M E. *17(2)*: 79-85. 1998.
- LACTATO DESHIDROGENASAS ACOPLADAS A LAS CADENAS RESPIRATORIAS. Jasso Chávez R, Torres Márquez M E y Moreno Sánchez R. *20(1)*: 39-47. 2001.
- LAGUNA GARCÍA. PRINCIPIOS Y DESARROLLO DE LA BIOQUÍMICA EN MÉXICO. UNA VISIÓN DEL DR. JOSÉ, Mas Oliva J. *16(Commemorativo)*: 17-22. 1997.
- LIPOPOLISACÁRIDOS: EXTRAORDINARIAS MOLÉCULAS ACTIVADORAS DE SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN CELULAR. Higashida Guerrero C y Gutiérrez Venegas G. *18(1)*: 28-35. 1999.
- MAPK-p38, SU ESTRUCTURA, CINÉTICA Y FUNCIÓN. LA, Torres Márquez M. E, Franco R y Ochoa de la Paz L D. *20(3)*: 167-174. 2001.
- MECANISMOS DE EXPULSIÓN DE METALES TÓXICOS EN BACTERIAS. Cervantes C. *19(1)*: 24-31. 2000.
- MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA F_0F_1 -ATPasa DE BACTERIAS. Pacheco Moisés F, Bravo Peralta M C y García Trejo J J. *19(4)*: 204-211. 2000.
- MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN PARA EL IFM GAMMA. Quijano Massiel del R y Pratz Pérez P. *20(3)*: 152-157. 2001.
- MECANISMOS QUE REGULAN LA DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE ACTINA. Reyes

Reyes M, Rosales C, Hernández R y López Villaseñor I. 20(3): 175-184. 2001.

MEMORIA INMUNE. LA, Silva G y Calderón Salinas J V . 16(3): 106-112. 1997

METABOLISMO DEL GLUTATIÓN EN MICROORGANISMOS Y PLANTAS. Mendoza Cózatl D, Avilés Rodríguez C, Hernández Navarro A, Loza Tavera H y Moreno Sánchez R. 20(4): 213-221.

METALOTIONEINAS, BIOQUÍMICA Y FUNCIONES PROPUESTAS. Brambila Colombres E M y Lozano Zaráin P. 18(1): 21-27. 1999.

MODELOS EXPERIMENTALES FISIOLÓGICOS PARA ESTUDIOS BIOQUÍMICOS: EL CORAZÓN AISLADO Y PERFUNDIDO. Vázquez Galván C y Carvajal K. 16(2): 61-66. 1997.

MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS ENZIMAS ¿UN ENFOQUE EXPERIMENTAL ANTICUADO? LA, Montero Morán G, Alvarez Añorve L I y Lara González S. 20(1): 30-38. 2001.

MOTILIDAD, BIOGÉNESIS FLAGELAR Y QUIMIOTAXIS BACTERIANA . González Pedrajo B y Dreyfus G. 18(4): 142-152. 1999.

NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS. LA, Pérez León J A y Salceda Sacanelles R. 16(4): 140-147. 1997.

NUEVAS ACCIONES DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES. Zentella de Piña M, Pimentel Velásquez L, Vázquez Meza H, Piña Zentella G y Riveros Rosas H. 19(3): 174-181. 2000.

NUEVOS PROGRAMAS DE ENSEÑANZA BIOQUÍMICA ASISTIDA POR COMPUTADORA. LOS, Fernández Rivera Río L. 16(4): 148-151. 1997.

ONDARZA VIDAURRETA. ENTREVISTA CON EL DR. RAÚL, Zentella Dehesa A. 16(Conmemorativo): 23-27. 1997.

PAPEL DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS CD8+ EN INFECCIONES POR PROTOZOARIOS INTRACELULARES. Salaiza Suazo N L y Becker Fauser I. 20(4): 264-268.

PAPEL DEL POTASIO DURANTE LA ISQUEMIA. EL, Castrejón Téllez V. 19(3): 158-163. 2000.

PAPEL ESENCIAL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES. Lledías F. 19(4): 212-218. 2000.

PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SUPRESORAS DE TUMORES (RB Y P53) Y LOS COMPLEJOS CDK-CICLINA EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR. López Marure R, Sánchez Sánchez L, Chávez González M A y Weiss Steider B. 17(2): 69-78. 1998.

PARTICIPACIÓN DEL EFECTO HIDROFÓBICO Y DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO INTRAMOLECULARES EN LA ESTABILIDAD CONFORMACIONAL DE LAS PROTEÍNAS. LA, Flores Herrera O, Pardo J P y Martínez F. 19(3): 146-157. 2000.

PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA MUERTE APOPTÓTICA NEURONAL EN EL DESARROLLO Y EN ALGUNAS PATOLOGÍAS. Valencia Pérez A y Morán Andrade J. 20(4): 222-233.

PROTEÍNAS DE ESTRÉS EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA. LAS, Broche Valle F, Céspedes Miranda E M y García Piñero J C. 18(3): 98-107. 1999.

PROTEÍNAS INSECTICIDAS DE *Bacillus thuringiensis*. Barboza Corona J E e Ibarra J E . 17(1): 3-10. 1998.

QUÍMICA ORGÁNICA: UN ENFOQUE BIOMÉDICO. Díez González T A . 19(1): 36-42. 2000.

RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE AMINOÁCIDOS EXCITADORES: CLASIFICACIÓN Y MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN. LOS, Frago Contreras, G y López Colomé A M . 16(3): 98-105. 1997.

REGULACIÓN EN LOS MECANISMOS DE CRECIMIENTO TISULAR. González Morán M G. 16(2): 53-60. 1997.

RELATORÍA DE EVENTOS EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM. LA VISIÓN DEL AUTOR. Guzmán García J. *16*(Conmemorativo): 43-48. 1997.

RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LA INFECCIÓN VIRAL. LA, Vivero JM y Calderón Salinas J V. *17*(4): 172-177. 1998.

ROCA OLIVÉ, FUNDADOR DE LA ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA EN MÉXICO. DON JUAN, del Rio Estrada C. *16*(Conmemorativo): 9-11. 1997.

RODOPSINAS: FOTORRECEPTORES DESDE LAS ARQUEOBACTERIAS HASTA LOS VERTEBRADOS. LAS, Michán S. *20*(4): 269-277.

SISTEMAS DE DOS COMPONENTES Y LA COMPLEJIDAD DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS. LOS, Raya Perez J C. *20*(2): 72-78. 2001.

TEORÍAS SOBRE LAS CAUSAS DEL ENVEJECIMIENTO. LAS, León Cázares J M y Flores Rodríguez M T E. *17*(2): 59-68. 1998.

TRANSPLANTE NUCLEAR Y CLONACIÓN DE ORGANISMOS SUPERIORES. Ortega R y Montiel F. *18*(1): 11-20. 1999.

TRANSPORTADORES DE CATIONES EN MITOCONDRIAS DE MAMÍFEROS. Zazueta Mendizábal A C. *18*(4): 166-173. 1999.

TRANSPORTE DE COLESTEROL EN LO TEJIDOS ESTEROIDOGÉNICOS. EL, Martínez F y Espinosa García M T, Maldonado G, García Pérez C, Navarrete J, Milán R, Flores Herrera O y Uribe A. *17*(4): 148-156. 1998.

USO DE 1-ANILINO-8 NAFTALENOSULFONATO (ANS), PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INTERMEDIARIOS EN LA RUTA DE PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS GLOBULARES. EL, Chánez Cárdenas M E *17*(1): 11-17. 1998.

TÍTULOS DE OTRAS COMUNICACIONES

A LA MEMORIA DE LA DOCTORA ADELA CUÉLLAR DE HERNÁNDEZ. Chávez Cosío E. *18*(4): 182. 1999.

ADOLFO GARCÍA SAINZ, PREMIO NACIONAL DE CIENCIAS Y ARTES 1997. Zentella Dehesa A. *16*(4): 159.

BASES MOLECULARES DE LA PERCEPCIÓN DEL PICANTE O LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE LA CAPSAICINA LAS, López Bojórquez L N. *18*(3): 125-127. 1999.

BIOLOGÍA FUNCIONAL DE LOS ANIMALES. COMENTARIO SOBRE EL LIBRO. Zentella Dehesa A. *18*(1): 36-37. 1999.

BIOLOGÍA MOLECULAR EN MEDICINA. COMENTARIO SOBRE EL LIBRO. Zentella Dehesa A. *18*(2): 82. 1999.

CÁTEDRA PATRIMONIAL DE EXCELENCIA. NIVEL II. Moreno Sánchez R. *18*(4): 183-184. 1999.

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN LAS CIENCIAS BIOMÉDICAS. LA, Ortiz Jiménez M A. *18*(2): 78-79. 1999.

COMENTARIOS DE UN ARTÍCULO. Carvajal Sandoval G. *16*(3): 115. 1997.

COMENTARIOS SOBRE EL LIBRO: "SEMBLANZAS, LOS FUNDADORES DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA, 1957-1997". EDITADO POR EL DR. RAÚL ONDARZA VIDAURRETA. Dehesa Zentella A. *16*(4): 157. 1997.

COMENTARIOS SOBRE LIBROS DE RECIENTE PUBLICACIÓN VIDA, ORIGEN Y CAOS: PROPUESTA PARA NUEVOS ENFOQUES EN BIOLOGÍA. Sánchez Esquivel S. *19*(1): 151. 2000.

COMENTARIOS SOBRE LIBROS DE RECIENTE PUBLICACIÓN. LAS CITOCINAS EN LA HEMATOPOYESIS Y SISTEMA INMUNOLÓGICO: MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES. Zentella Dehesa A. *19*(2): 110-111. 2000.

COMENTARIOS SOBRE LIBROS DE RECIENTE PUBLICACIÓN. Rojas del Castillo E. *18*(4): 185. 1999.

COMPATIBILIDAD EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR ENTRE NÚCLEO Y CITOPLASMA: UNA LIMITACIÓN EN LA CLONACIÓN DE MAMÍFEROS. Zentella Dehesa A. *17(3)*: 132-134. 1998.

CRUCIBIOQ. ÁCIDOS, BASES Y SALES. Saldaña Balmori Y. *18(3)*: 129. 1999.

CRUCIBIOQ. QUÍMICA DE PROTEÍNAS. Saldaña Balmori Y. *18(4)*: 187 y 188. 1999.

CRUCIBIOQ. ENZIMAS. Saldaña Balmori Y. *19(1)*: 53 y 55. 2000.

CRUCIBIOQ. QUÍMICA DE CARBOHIDRATOS. Saldaña Balmori Y. *19(2)*: 113 y 116. 2000.

CRUCIBIOQ. QUÍMICA DE LÍPIDOS. Saldaña Balmori Y. *19(3)*: 183 y 186. 2000.

CRUCIBIOQ. VITAMINAS. Saldaña Balmori Y. *19(4)*: 238 y 241. 2000.

CRUCIBIOQ. QUÍMICA DE NUCLEÓTICOS. Saldaña Balmori Y. *20(1)*: 55 y 57. 2001.

CRUCIBIOQ. RADICALES LIBRES. Saldaña Balmori Y. *20(2)*: 115 y 119. 2001.

CRUCIBIOQ. CICLO DE KREBS. Saldaña Balmori Y. *20(3)*: 189 y 191. 2001.

CRUCIBIOQ. GLUCÓLISIS. Saldaña Balmori Y. *20(4)*: 279 y 282. 2001.

DISCURSO DEL DR. ADOLFO GARCÍA SÁINZ AL RECIBIR EL PREMIO NACIONAL DE CIENCIAS Y ARTES 1997. *17(1)*: 33-34. 1998.

DEL BUEN DECIR. Juárez Oropeza M A. *18(2)*: 76-77. 1999.

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA ES DESIGNADO PROFESOR EMÉRITO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. EL, Saldaña Balmori Y. *17(4)*: 178-179. 1998.

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA, PROFESOR EMÉRITO DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y FUNDADOR DEL BEB Y DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA. Zentella Dehesa A. *17(4)*: 180.1998.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR A PROTEÍNAS MODIFICADAS, RECEPTOR "BASURERO" O "scavenger". Mas Oliva J. *17(1)*: 31-32. 1998.

FALTA DE MOTIVACIÓN COMO MECANISMO DE SELECCIÓN NATURAL EN EL PROCESO DE EVOLUCIÓN DENTRO DE LOS PROGRAMAS DE POSGRADO. LA, Hernández Angeles A. *18(1)*: 39-40. 1999.

FALLECIÓ EL DR. JOAQUIN CRAVIOTO MUÑOZ. *17(2)*: 87. 1998.

GÜNTER BLOBLE, PREMIO NOBEL 2000: LOS CÓDIGOS POSTALES DE LA CÉLULA Y EL MECANISMO MOLECULAR QUE DETERMINA EL DESTINO SUBCELULAR DE CADA PROTEÍNA. Zentella Dehesa A. *19(1)*: 43-46. 2000.

HAY QUE DARLE MAYOR CRÉDITO AL ORIGEN EXTRATERRESTRE DE LA VIDA. Del Campo González J G. *18(2)*: 81. 1999.

HERMINIA PASANTES MORALES ORDÓNEZ: INVESTIGADORA EMÉRITA DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Salceda Sacanalles R. *17(2)*: 86. 1998.

INFORME DEL XXIV TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA. Morales López S, Juárez Oropeza M A, Pardo Vázquez J P y Martínez Montes F. *16(4)*: 153-156. 1997.

INFORME DEL XXV TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA. Morales López S, Juárez Oropeza M A, Pardo Vázquez J P y Martínez Montes F. *17(4)*: 181-184. 1998.

INFORME DEL XXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA. Morales López Sara, Juárez

Oropeza M A, Pardo Vázquez J P y Martínez Montes F. *19(1)*: 47-50. 2000.

INQUIETUD SOBRE LA PUNTUACIÓN EN LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL BEB. Milán Chávez R. *17(3)*: 130. 1998.

INVESTIGACIÓN BÁSICA CONTRA TECNOLOGÍA. Alcázar Montenegro H. *16(3)*: 113-114. 1997.

LINO DÍAZ DE LEÓN OBITUARIO. Laclette J P y Chimal Monroy J. *18(4)*: 180-182. 1999.

MICROORGANISMOS: ¿ACASO PLURICELULARES TAMBIÉN? Hernández Pech X E. *16(2)*: 67-68. 1997.

MOVIMIENTO DE PROTONES A TRAVÉS DEL COMPLEJO bc₁. ¿BOMBEO O TRANSLOCACIÓN NETA? EL, Covián R y Moreno Sánchez R. *20(3)*: 186-187. 2001.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. BIOENERGÉTICA. Moreno Sánchez R. *18(2)*: 79. 1999.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. BIOENERGÉTICA. Rodríguez Enríquez S y Moreno Sánchez R. *18(3)*: 128. 1999.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. ACTIVACIÓN NO ESENCIAL. Pacheco Moisés F y Moreno Sánchez R. *20(2)*: 114-116. 2001.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. Covián R y Moreno Sánchez R. *19(1)*: 52 y 54. 2000.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. ENZIMAS ALOSTÉRICAS. Juárez O y Moreno Sánchez R. *20(1)*: 54 y 56. 2001.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. Moreno Sánchez R y Castillo A. *18(4)*: 186 y 189.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. Varela Gómez M y Moreno Sánchez R. *19(2)*: 112, 114 y 115. 2000.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA. INACTIVACIÓN TÉRMICA. Varela Gómez M y Moreno Sánchez R. *19(3)*: 182, 184 y 185. 2000.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CONTROL METABÓLICO. Rodríguez Enríquez S y Moreno Sánchez R. *20(3)*: 188 y 190. 2001.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CONTROL METABÓLICO. Rodríguez Enríquez S y Moreno Sánchez R. *19(4)*: 237, 239 y 240. 2000.

PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. INHIBICIÓN DE TIPO MIXTO. Jasso Chávez R y Moreno Sánchez R. *20(4)*: 278, 280 y 281.

RECONOCIMIENTO A LA DOCTORA ESTELA SÁNCHEZ. Gavilanes Ruiz M. *16(4)*: 158. 1997.

RICARDO TAPIA IBARGÜENGOITIA: INVESTIGADOR EMÉRITO DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. León Cázares J M. *16(2)*: 71-72. 1997.

SOBRE EL BOMBEO DE PROTONES POR EL CITOCROMO bc₁. Pardo J P, Martínez F, Rendón J L y Flores O. *20(3)*: 184 y 185. 2001.

SOBRE LOS PUNTOS DE LAS ABREVIATURAS. León Cázares J M *17(3)*: 130-131. 1998.

TEORÍA DE LA EVOLUCIÓN NO ES UN DECRETO. LA, Calderón Salinas J V. *16(1)*: 22-25. 1997.

TRABAJOS DE MILLER Y FOX. SU INFLUENCIA SOBRE LAS IDEAS ACERCA DEL ORIGEN DE LA VIDA EN LA TIERRA. LOS, Matrajit Arbetman G. *16(1)*: 27-28. 1997.

UN AGRADECIMIENTO A LA SRA. ELISA MORA DE SALLES. Calderón Salinas J V. *18(1)*: 38. 1999.

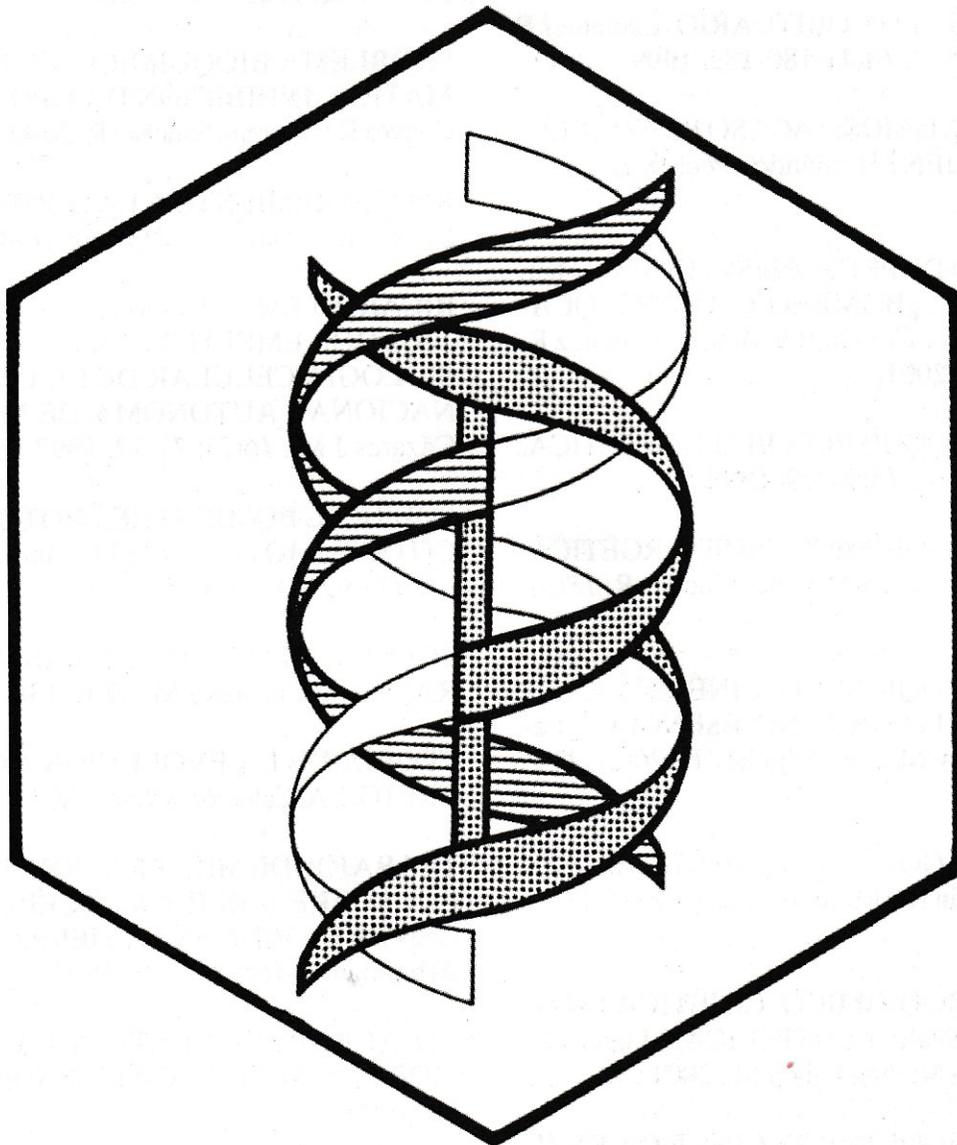
UN EDITOR EN JEFE LLAMADO DR. LEÓN. Florido Segoviano A y Calderón Salinas J V. *16(2)*: 73. 1997.

UNA REFLEXIÓN NECESARIA. Zavala Olalde J C. *16(1)*: 26. 1997.

VI CONGRESO. Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. 17(1): 35-36. 1998.

VI CONGRESO. Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. 17(2): 88. 1998.

VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ: INVESTIGADORA EMÉRITA DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. León Cázares J M. 16(2): 69-70. 1997.



CORRESPONSALES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C o suscriptor del BEB y vives fuera de la Ciudad de México, te invitamos a que seas corresponsal de nuestra revista en el sitio donde radiques.

Nos interesa contar con corresponsales adscritos a las Instituciones de Educación Superior en todos los estados de la República, así como en lugares de Centro y Sudamérica, España y otros sitios en donde el BEB sea leído.

También nos interesa conocer y publicar las noticias más significativas que en nuestro campo ocurran en los diferentes lugares, ya sean seminarios, cursos, congresos, talleres, publicaciones, etc.

En el documento Normas del Comité Editorial, que es el que nos rige, hay un apartado para esta actividad, mismo que a continuación se transcribe:

5. DE LOS CORRESPONSALES

5. a) Los corresponsales del BEB son profesores y/o investigadores, que sin formar parte del Comité Editorial, coadyuvan en las actividades de la revista. El corresponsal debe ser un miembro sobresaliente de la comunidad académica local o regional. Es deseable un corresponsal en cada una de las Instituciones de Educación Superior de la República Mexicana, Centroamérica, Sudamérica y otras regiones de habla hispana.

5. b) Uno de los editores se encargará de la coordinación de los corresponsales y de la comunicación con ellos para lograr que los objetivos se cumplan. El puesto será rotatorio y se cambiará cada dos o cuatro años, de acuerdo con el Comité Editorial.

5. c) La proposición de corresponsales se hará, mediante documento firmado por cuando menos dos de los editores, que se acompañará con el *Curriculum Vitae* del candidato propuesto.

5. d) La discusión del ingreso de un corresponsal deberá realizarse después de que el Coordinador de Corresponsales haya circulado la información correspondiente y con la asistencia en pleno del Comité Editorial.

5. e) Para ser aceptado, el candidato deberá contar con la aprobación por consenso de los miembros del Comité Editorial.

5. f) En caso de ser admitido, se le hará una invitación formal a la que se anexarán estas normas. Iniciará sus actividades como corresponsal, al recibir el Editor en Jefe la aceptación escrita del candidato.

5. g) El Comité Editorial dará el crédito correspondiente a los corresponsales en la revista en el formato que el propio Comité decida.

5. h) La salida de un corresponsal puede ser por renuncia voluntaria, presentada por escrito, o bien por acuerdo del Comité Editorial, después de la evaluación de sus actividades.

5.1 RESPONSABILIDADES DE LOS CORRESPONSALES

5.1.a) Envío a través del Coordinador de Corresponsales de al menos una contribución propia o de su comunidad al año y de las noticias relevantes de su localidad o región.

5.1.b) Mantenimiento del archivo de los suscriptores del BEB de su localidad y comunicación inmediata de los cambios en él.

5.1.c) Colaboración en la promoción, difusión y distribución del BEB entre los miembros de su comunidad.

5.1.d) Colaboración en las promociones de financiamiento económico de la revista.

5.1.e) Elaboración y envío anual de un informe de sus labores que a través del Coordinador de Corresponsales se hará llegar al Comité Editorial junto con una crítica a los números correspondientes.

Por favor, dirige tu correspondencia a la Coordinadora de Corresponsales, Comité Editorial del BEB, Apartado Postal 70-281, México, 04510, DF, MÉXICO, o bien a: Tel: (52) 5623-2168 / Fax: (52) 5616-2419.

email: balmori@laguna.fmedic.unam.mx

Yolanda Saldaña Balmori
Coordinadora de Corresponsales del BEB.

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

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 que revisen algunos de los últimos números de esta publicación para que vean estilo, tipos de abreviaturas, etc., así como que se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 1) El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en los procesadores de textos "Winword" o "Word-perfect", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Éste deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo y de la solicitud para su publicación, firmada por cada uno de los autores.
- 2) El trabajo debe iniciarse con el título del artículo, nombre de los autores, iniciando por nombre propio completo y marcado como pie de nota, la afiliación del o los autores (por ejemplo: departamento e institución), domicilio, código postal, ciudad, estado, país, teléfono, fax y correo electrónico en caso de tenerlos. Debe incluirse cuatro renglones más abajo, un título breve con un máximo de 60 caracteres, incluyendo los espacios, para insertarlo como cabeza de página.
- 3) Se deberá incluir un resumen en idioma español y uno en inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.
- 4) Se sugiere un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas entre paréntesis 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 oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, 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:

Fraga C G y Oteiza P I (1995) Vitaminas antioxidantes: Bioquímica, Nutrición y participación en la prevención de ciertas patologías. *Bol Educ Bioq* 14:12-17.

Weindruch R (1996) Caloric restriction and aging. *Sci Amer* 274:32-38.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The molecular biology of immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, pp 81-104.

Los libros se citarán de acuerdo con este ejemplo y podrán incluir las páginas totales o las consultadas:

Lehninger A L, Nelson D L y Cox M M (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 5) Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, figuras más tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o bien impresiones láser 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. Las tablas se deberán presentar conforme alguna de las publicadas en los números de 1999. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá dársele el crédito correspondiente u obtener el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse así (Fig. X) numerándolas con arábigos. Las tablas siempre llevarán la inicial a mayúscula y se numerarán con romanos.

- 6) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.
- 7) Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

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, comentarios o erratas de artículos publicados previamente, etcétera.
- 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 aceptará un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto según el inciso I-4. En caso de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla, de acuerdo con las características que se indican en el inciso I-5.

Los manuscritos serán leídos por tres revisores en un lapso no mayor de dos meses. Las correcciones y sugerencias, así como las pruebas de página se enviarán al primer autor. En caso necesario se recurrirá a revisores externos al Comité Editorial.

El disco y las tres copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal del BEB en su localidad.

CONTENIDO

EDITORIAL

VIGÉSIMO ANIVERSARIO

José Víctor Calderón Salinas y
Yolanda Saldaña Balmori 204

ARTÍCULOS

**ASTROCITOS, ÓXIDO NÍTRICO Y
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**
Ana Gadea y Ana María López Colomé 206

**METABOLISMO DEL GLUTATIÓN
EN MICROORGANISMOS Y PLANTAS**
David Mendoza Cózatl, César Avilés Rodríguez,
Andrea Hernández Navarro, Herminia Loza
Tavera y Rafael Moreno Sánchez 213

**PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES
REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA MUERTE
APOPTÓTICA NEURONAL EN EL DESARROLLO
Y EN ALGUNAS PATOLOGÍAS**
Antonio Valencia Pérez y
Julio Morán Andrade 222

**ENZIMAS MÁS ALLÁ DE SU ÁMBITO
FISIOLÓGICO: LIPASAS**
Ismael Bustos Jaimes, Gabriela M. Montero
Morán, Samuel Lara González y
Laura I. Álvarez Añorve 234

**FOSFOLIPASA C ESPECÍFICA DE
FOSFOINOSÍTIDOS, ESTRUCTURA Y PAPEL
EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES**
Samuel Lara González y
Gabriela M. Montero Morán 241

**GENERALIDADES SOBRE LA BIOQUÍMICA
DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS**
Edmundo M. Rodríguez Campos y
Alberto Hamabata 254

**PAPEL DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS
CD8+ EN INFECCIONES POR PROTOZOARIOS
INTRACELULARES**
Norma Lilia Salaiza Suazo e
Ingeborg Becker Fauser 264

**LAS RODOPSINAS: FOTORRECEPTORES
DESDE LAS ARQUEOBACTERIAS
HASTA LOS VERTEBRADOS**
Shaday Michán 269

OTRAS COMUNICACIONES

**PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA
ENZIMÁTICA. INHIBICIÓN DE TIPO MIXTO**
Ricardo Jasso Chávez y
Rafael Moreno Sánchez 278

CRUCIBIOQ. GLUCÓLISIS.
Yolanda Saldaña Balmori 279

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Ricardo Jasso Chávez y
Rafael Moreno Sánchez 280

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori 282

CONVOCATORIAS

**REGISTRO DE CANDIDATOS PARA OCUPAR
LA PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN
MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA,
A. C. DURANTE EL BIENIO 2002-2004 283**

**CORRESPONSALES DEL BOLETÍN
DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 301**

**INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DEL BOLETÍN
DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 302**