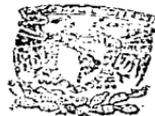


7
24.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

FACULTAD DE QUIMICA



**MODULACION POR CARGA ENERGETICA Y
CATABOLITOS DE ADENOSINA DEL RECEPTOR
DE RYANODINA (RYR) DE MUSCULO
ESQUELETICO**

Tesis que para Obtener el Título de

Químico

Presenta

Armando Butanda Ochoa

México, D.F. Ciudad Universitaria, 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesora Guadalupe Vélez Pratt.

VOCAL: Profesor Homero Hernández Montes.

SECRETARIO: Profesor: Mauricio Díaz Muñoz.

1er. SUPLENTE: Profesora María Teresa Romero Avila.

2do. SUPLENTE: Profesora Alicia Castillo Martinez.

LUGAR DONDE SE REALIZO EL TRABAJO:

**INSTITUTO DE FIOLOGIA CELULAR
(DEPARTAMENTO DE BIOFISICA)**

**FACULTAD DE QUIMICA
(DEPARTAMENTO DE FISICA Y QUIMICA
TEORICA)**


Asesor: Prof. Mauricio Díaz Muñoz.


Supervisor Técnico: Prof. Germund Höjer.


Sustentante: Armando Butanda Ochoa.

“.....toda nuestra ciencia, comparada con la realidad, es primitiva e infantil, pero es lo más hermoso que tenemos.”

En algún lugar del Cosmos:

**Albert Einstein
(1879-1955)**

Dedico este humilde esfuerzo:

A mis viejos, que con tanto esfuerzo, me han enseñado a discernir bien para poder escoger el camino de la verdad, siempre bajo mi propia convicción.

A mi hermanita Illiana, por la solidaridad de siempre.

A Mauricio, la voz que cura, de quien se aprende a saber lo que se quiere y a compartir lo que se tiene y lo que se sabe sin escatimar jamás.

A Rolando, de quien se aprende que las ideas claras y sencillas son las que verdaderamente trascienden.

A Adriana, mi razón de ser y la luz que alumbra mi camino.

A mi abuelita, a mis tíos y tías, a mis pequeñas y pequeños, por el cariño que siempre reconforta.

Al rey Arturo y a su encantadora reina por enseñarme los secretos de la verdadera amistad.

A la Maestra Yolanda, por compartir conmigo su incansable entusiasmo por la ciencia y al Dr. Federico, por enseñarme a hacer de la ciencia una manera de ser, de pensar y de vivir.

Al Dr. Germund, por enseñarme la magia de la Mecánica Cuántica.

A la Maestra Rayito, por ayudarme a descubrir que puedo creer en mi trabajo.

Al Dr. Antonio Peña Díaz por sus oportunos consejos que me permitieron aterrizar en el fascinante mundo de la Bioquímica

A los Hooligans, por compartir conmigo un pedacito de su alegría.

Y a todos aquellos que, simplemente, han creído mi y que han dejado las lecciones de vida que hoy forman la biblioteca de mis recuerdos y de mis convicciones.

AGRADECIMIENTOS

Alguna vez alguien dijo que nadie hace ciencia sólo y en verdad tenía razón. Por ello, quiero agradecer al Dr. Mauricio Díaz Muñoz tanto su amistad y paciencia para dirigir este trabajo como su constante disposición para compartir nuevas ideas, aún las más descabelladas.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz quiero agradecer, no sólo el gran apoyo y los atinados comentarios que siempre brindó a este proyecto, sino también el honorarme con su amistad.

A la Dr. Germund Höjer, por participar de la dirección de este trabajo, ya que sin su colaboración, el estudio nunca hubiera alcanzado las metas trazadas.

A la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez por permitirnos realizar las mediciones por HPLC en su laboratorio, las cuales, de hecho fueron, realizadas por la Biol. Susana Vidrio Gómez, a quien agradezco muy especialmente su ayuda y deseo rendirle un muy merecido reconocimiento por el valor de su aportación en este trabajo.

Al Biol. Rafael Cañedo Merino y a la M. en IBB. María Teresa Martínez Merlos por su sincera amistad y por su apoyo, siempre entusiasta, en la realización de algunos de los experimentos.

Al Biol. Gerardo Coello Coutiño y al Ing. Rodrigo Montúfar Chaveznava por su ayuda y asesoría en el procesamiento de las imágenes de computadora obtenidas con los cálculos teóricos con los catabolitos de adenosina.

Al Dr. José Adolfo García Sáinz y a la Dra. Claudia González Espinosa por permitirnos utilizar los programas de predicción de estructura secundaria y por su apoyo en la aplicación de los mismos.

Al Nutriólogo Fernando López Barrera por su apoyo en la elaboración por computadora de algunos de los esquemas que se presentan en los antecedentes de este texto.

Al Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación de la Coordinación de Programas Académicos de la Secretaría General de la UNAM, por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

A la Facultad de Química y al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por su entera convicción en la formación de profesionales comprometidos con su país.

Finalmente quiero agradecer a los miembros del jurado por sus observaciones y a todas aquellas personas que, de alguna manera, han contribuido al desarrollo de este largo, pero fructífero trabajo.

INDICE

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	4
El Tejido Muscular	5
La Contracción Muscular	11
El Receptor de Ryanodina (RyR)	21
Carga Energética (CE) y la Modulación del RyR por Nucleótidos de Adenina otros Derivados de Purina	25
Aspectos Teóricos sobre la Estructura de la ADO y sus Catabolitos como Factor Relevante en su Actividad frente al RyR	31
Sitios de Reconocimiento de ATP en el RyR	35
HIPOTESIS	39
OBJETIVOS	41
METODOLOGIA	43
REACTIVOS	44
METODOS	45
Obtención del Músculo Esquelético Rápido	45
Procedimiento para el Aislamiento del Reticulo Sarcoplásmico Pesado (RSP)	45
Determinación de la Concentración de Proteína en la Fracción Aislada	47

Caracterización del RyR por Electroforésis en Geles de Poliacrilamida	47
Ensayos de Unión Especifica con [³ H]-Ryanodina	47
Determinaciones por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)	48
Cálculo del Vector Momento Dipolar (μ)	49
Predicción de Estructura Secundaria	51
RESULTADOS	52
Caracterización del RyR por Electroforésis en Geles de Poliacrilamida	53
Determinaciones por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)	53
Ensayos de Unión Especifica con [³ H]-Ryanodina	59
Cálculo del Vector Momento Dipolar (μ)	74
Diferencia de Energía (ΔE) entre HOMO y LUMO	80
Predicción de Estructura Secundaria	81
DISCUSION	84
Modulación por Carga Energética	85
Modulación por ADO y sus Catabolitos	90
CONCLUSIONES	99
PERSPECTIVAS	101
LITERATURA CITADA	103

RESUMEN

En los animales, el movimiento se lleva a cabo mediante la contracción de los músculos, este proceso, a su vez, se realiza gracias a un fenómeno conocido como acoplamiento excitación-contracción, en el cual la despolarización, producto de un impulso nervioso, que se propaga por la membrana plasmática provoca un cambio conformacional en un canal de calcio sensible a voltaje conocido como receptor de dihidropiridina (DHPR) y que está incertado en las invaginaciones de la membrana plasmática o túbulos transversos que, junto con el retículo sarcoplásmico que los rodea, forman lo que se conoce como triada. Ese cambio conformacional permite que el receptor de dihidropiridinas entre en contacto directo con otro canal liberador de calcio o receptor de ryanodina (RyR). El contacto directo de ambas proteínas provoca la liberación del calcio contenido en el retículo sarcoplásmico en cuya membrana se ubica el receptor de ryanodina. Al entrar en contacto con la sarcómera, ese calcio liberado regula la contracción muscular.

En la contracción muscular existen otros procesos asociados además de la excitación-contracción, entre ellos se encuentra la hidrólisis del trifosfato de adenosina ó ATP que sirve como fuerza motriz. Esta hidrólisis permite la coexistencia en el citoplasma de tres nucleótidos de adenina: el monofosfato de adenosina ó AMP, el difosfato de adenosina ó ADP y el ATP), en una relación que resiste fuertemente a los cambios en el metabolismo celular y que es conocida como Carga Energética (CE). Es sabido que los nucleótidos de adenina son activadores del receptor de ryanodina. Sin embargo, aún no se ha definido si la carga energética es capaz de modular al receptor de ryanodina. En este estudio se aborda este problema y, visualizando a los nucleótidos de adenina como derivados de purina, se extiende la pregunta para averiguar: 1) si otros derivados de purina, como la adenosina (ADO) y sus catabolitos, pueden ser reconocidos por el receptor de ryanodina en los mismos sitios propuestos para el ATP; y 2) Mediante cálculos mecánico-cuánticos establecer parámetros fisicoquímicos, como el vector momento dipolar (μ), que permitan relacionar la estructura de las moléculas moduladoras con su efecto sobre el receptor de ryanodina.

Los resultados, obtenidos con las membranas del retículo sarcoplásmico pesado y los ensayos de unión específica con [3 H]-ryanodina, señalan que la carga energética puede modular al receptor de ryanodina, pero sólo al disminuirla drásticamente provoca un abatimiento de la activación del receptor. Además, los nucleótidos de adenina, en condiciones fisiológicas, muestran un patrón de modulación complejo.

Estas observaciones conllevaron al planteamiento de un modelo general para explicar la sensibilidad que muestran los puntos de regulación (entidades reguladoras) involucrados en diferentes procesos vitales, frente a los cambios que ocurren en la fisiología de un individuo.

Por otro lado, la adenosina y sus catabolitos mostraron un efecto modulador sobre el receptor de ryanodina y son reconocidos en sitios que se encuentran ya sea en contacto directo o comunicados a larga distancia con los sitios propuestos para el reconocimiento del ATPy cuya estructura secundaria se predijo como asas hidrofílicas.

Los cálculos teóricos permitieron establecer que la modulación de la adenosina y sus catabolitos depende de la presencia del anillo de ribosa, de la orientación y magnitud del vector momento dipolar y de la simetría de la molécula moduladora. Así mismo, en la estructura de estos derivados de purina se distinguieron regiones que modulan diferencialmente la activación del receptor de ryanodina.

Los cálculos también sugieren que estos derivados de purina no requieren experimentar una transición a un estado activado para ejercer sus efectos modulatorios sobre el receptor de ryanodina.

Los resultados obtenidos en este trabajo plantean nuevas metas que permitirán completar el estudio y establecer a largo plazo un modelo molecular que explique la dinámica de la interacción de las purinas con el receptor de ryanodina.

ANTECEDENTES

EL TEJIDO MUSCULAR

Una de las principales funciones que caracterizan a los animales es el movimiento. Particularmente, los mamíferos, como el hombre, llevan a cabo la actividad motriz mediante la contracción de las células que constituyen el tejido muscular, el cual consta de tres elementos básicos:

- 1) Las fibras musculares, que se disponen en haces o fascículos.
- 2) Una red capilar que provee oxígeno y nutrientes y, además, elimina residuos no deseados.
- 3) Tejido conectivo (formado de matriz extracelular) por donde se ubican vasos sanguíneos y nervios. Este tejido conserva unidas las fibras musculares y proporciona un sostén que permite la transmisión del movimiento que produce la contracción muscular.

Con base en factores estructurales y funcionales, existen tres tipos de tejido muscular:

- a) El músculo estriado o esquelético. Cuyo movimiento puede controlarse a voluntad y que se encuentra insertado en huesos o aponeurosis. Constituye las paredes del cuerpo de los animales.
- b) El músculo cardíaco. Que forma las paredes del corazón y su movimiento es involuntario.
- c) El músculo liso. Que se encuentra en las paredes de las vísceras huecas y en la mayor parte de los vasos sanguíneos. Su movimiento también es involuntario.

De estos tres tipos, es el músculo esquelético el que particularmente interesa en este estudio.

El tejido conectivo relacionado con el músculo esquelético se organiza en tres capas (Fig.1). La más externa es el epimisio, cuya apariencia es como de una vaina blanca. Dentro de ella se encuentran las fibras musculares dispuestas en haces, o fascículos. Rodeando cada fascículo se encuentra una capa más fina llamada perimisio y dentro de cada fascículo existe una capa todavía más delgada que rodea y penetra entre las fibras musculares individuales, conocida como el endomisio. La cantidad de tejido conectivo total varía desde abundante y grueso como en los glúteos, hasta escaso y delgado, como en el psoas. En el punto de unión del músculo al tendón, aponeurosis, rafe, dermis o periostio; el perimisio se fusiona con el tejido conectivo de ellos.

Las fibras del músculo esquelético, presentan una estriación longitudinal y transversal y varía de 1 a 40 mm o más de longitud y de 10 a 100 μm de diámetro. Cada fibra (Fig.2) muestra varios núcleos (35 por mm aproximadamente) ubicados por debajo del sarcolema (conjunto formado por el plasmalema, su lámina basal y las microfibrillas colágenas). En el sarcoplasma (citoplasma), aunque en su mayor parte está ocupado por filamentos cilíndricos y largos, dispuestos paralelamente llamados miofibrillas (1 a 3 μm de diámetro con estriación transversal regular), también se aprecian las mitocondrias o sarcosomas, aparatos de Golgi y vesículas que contienen glucógeno y algunas gotas de lípido. Al realizar un corte longitudinal de las fibras musculares, se aprecia, por microscopía fotónica, la disposición de las miofibrillas. De esta manera, se observan bandas oscuras A (anisotrópicas), alternadas con las bandas I que son claras (isotrópicas). En medio de las bandas A (que se tiñen más que las I) se aprecia una banda H que se tiñe con menos intensidad. Al centro de ésta última, se hace visible una línea M delgada y oscura. Al centro de las bandas I, se ven las líneas o discos Z y el segmento que va de una a otra línea Z se denomina sarcómera.

Por otro lado, las miofibrillas están formadas por unidades más pequeñas denominadas miofilamentos que son de dos tipos: los gruesos (1.5 μm de long. y 12 a 15 nm diám.) constituidos por miosina y los delgados (1 μm long. y 5 nm diám.) compuestos por actina. Estos miofilamentos están dispuestos en forma regular en la sarcómera. Así, los filamentos delgados están unidos a los discos Z y se extienden a través de las bandas I hasta parte de las bandas A, donde se intercalan con los filamentos gruesos, los cuales constituyen a la banda H y al centro de ésta, en la línea M, los filamentos gruesos están conectados entre sí por filamentos finos dispuestos radialmente, por lo que cada uno está conectado en el plano transversal con los seis filamentos gruesos adyacentes. En la Fig.3 se ilustran los niveles jerárquicos de organización del músculo esquelético.

Cada fibra muscular, contiene en su interior un sistema membranoso de retículo endoplásmico llamado retículo sarcoplásmico (Fig.2). Este sistema continuo presenta elementos tubulares longitudinales (retículo sarcoplásmico ligero) con conexiones transversales en la región de la banda H y cisternas terminales de mayor calibre (retículo sarcoplásmico pesado) que se comunican con aquellos primeros en las uniones A-I. De esta forma, se tienen dos cisternas terminales por sarcómera y en cada unión A-I se cuenta con dos cisternas terminales aportadas por cada sarcómera. Ambas cisternas están divididas por una invaginación del sarcolema superficial llamada túbulo transversal o T, formándose lo que se conoce como una triada. En el aspecto funcional, los túbulos T participan en la propagación de la excitación y despolarización de la membrana plasmática a toda la fibra muscular.

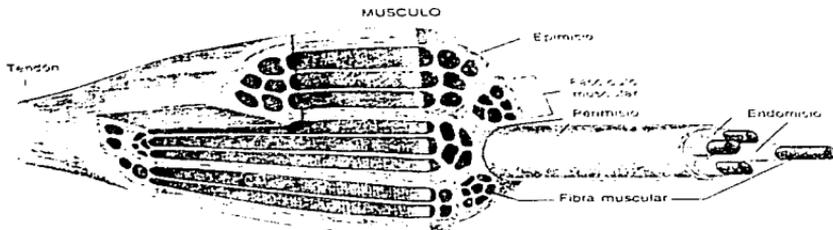


Fig 1. El músculo esquelético envuelto por las tres capas de tejido conectivo: epimisio, perimisio y endomisio. Tomada de: Leeson *et al.*, 1990.

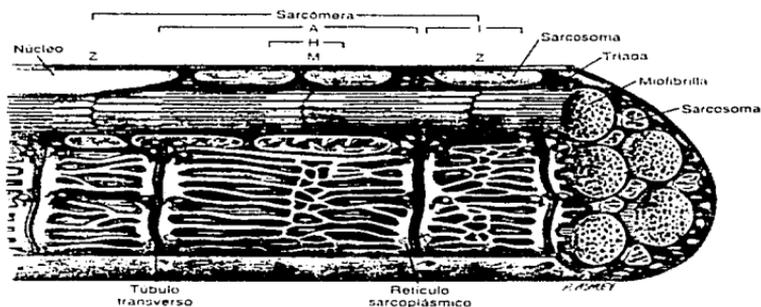


Fig.2. Fibra muscular de mamífero. Las mitocondrias están intercaladas entre las miofibrillas y los núcleos se encuentran cerca del sarcosoma. La red de membranas es el retículo sarcoplásmico. Tomada de: Leeson *et al.*, 1990.

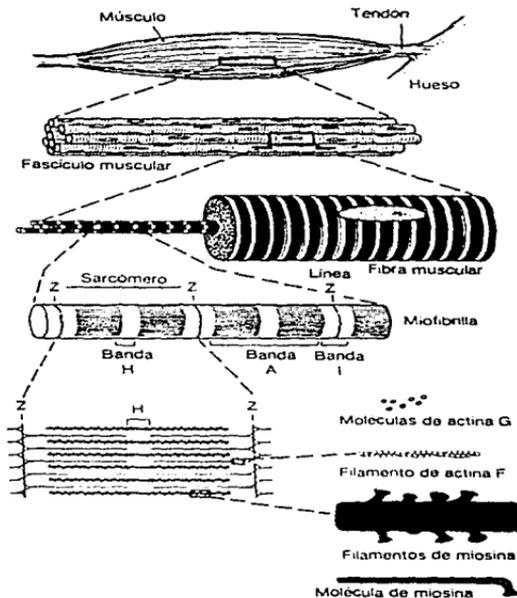


Fig.3. Niveles jerárquicos en la organización del músculo. Tomada de Eckert y Randall, 1994.

Ya se ha mencionado que los filamentos gruesos y los delgados están principalmente constituidos por miosina y actina, respectivamente. Sin embargo, una descripción más detallada de estas proteínas, dará una visión más clara y profunda, no sólo de la composición y la estructura del músculo, sino que permitirá, además, una mejor comprensión del fenómeno de la contracción muscular.

La miosina, que constituye un 60 a 70% del músculo esquelético, es una proteína que consiste de seis cadenas polipeptídicas altamente conservadas. Dos de las cuales son de alto peso molecular y los otros dos pares son cadenas ligeras diferentes denominadas LC1 y LC2. El extremo N-terminal presenta dos cabezas de forma globular ($55 \times 200 \text{ \AA}^2$) y el extremo C-terminal forma dos cadenas superenrolladas en espiral α de unos 1500 \AA de largo, la cual presenta siete aminoácidos repetidos (a-b-c-d-e-f-g) dos de los cuales -los a y b- son no polares. En el músculo esquelético, los filamentos gruesos están formados por varios cientos de cadenas de miosina dispuestas hacia los extremos en forma regular, quedando una zona descubierta en el centro. Otra característica importante de la miosina es que posee actividad de ATPasa, es decir que es capaz de hidrolizar ATP, para potenciar la contracción. Si la miosina se degrada con tripsina se ve que las cabezas globulares, llamadas S1 (Fig. 4c), son las responsables de la actividad ATPásica de la miosina. Los otros fragmentos que se obtienen por la degradación con tripsina son la meromiosina ligera y la meromiosina pesada que al degradarse más genera tres fragmentos: las cabezas globulares (S1) y un fragmento (S2) superenrollado.

La otra proteína importante en la composición del músculo (20 a 25%), es la actina. Esta proteína es globular a fuerzas iónicas bajas (actina G), pero en condiciones fisiológicas se polimeriza (actina F) y forma un filamento helicoidal doble. Cada monómero de actina-F puede unirse a una cabeza S1 de miosina, con una orientación específica -como en forma de punta de flecha- con respecto al eje fibroso.

Además de la actina, otras proteínas se asocian a los filamentos delgados:

1) La tropomiosina. Que es un heterodímero con dos subunidades que forman una hélice α de 400 \AA de largo y que están enredadas entre las estrías de la actina-F, de manera que cada molécula de tropomiosina está en contacto con siete monómeros de actina.

2) La troponina. Que consiste de tres subunidades: la troponina C (dependiente de Ca^{+2}), la troponina I (unida a la actina) y la troponina T (unida a la tropomiosina).

Este complejo tropomiosina-troponina juega un papel importante en la regulación de la contracción muscular, ya que controla el acceso de las cabezas S1 de la miosina a sus sitios de unión en la actina.

Existen otras proteínas estructurales que también están relacionadas con el músculo esquelético, tal es el caso de la α -actina que se localiza en el interior de las bandas Z, de la β -actina que -según se cree- funciona como un factor controlador de la longitud de los filamentos delgados, de la desmina y la vimentina que se ubican en la periferia de las bandas Z y de las proteínas C y M que están asociadas a las bandas M y que probablemente participan del ensamblaje de los filamentos gruesos. Es interesante señalar que los invertebrados presentan filamentos gruesos que contienen paramiosina, misma que en algunos de sus músculos es el componente predominante. En la Tabla 1, se muestran los pesos moleculares de todas las proteínas citadas:

TABLA I

PROTEINA	P.M. (kD)
Miosina	540
Cadena Pesada	230
LC1	~20
LC2	~20
Actina-G	42
Tropomiosina	33
Troponina	72
TnC	18
TnI	23
TnT	31
α -Actina	200
β -Actina	34
Desmina	50
Vimentina	52
Proteína-C	150
Proteína-M	100

Hasta aquí se ha ofrecido una visión general de la estructura y la composición del músculo esquelético, no obstante, es necesario preguntarse sobre la manera en cómo toda esta maquinaria funciona para producir movimiento. En la sección siguiente, se presenta un panorama sobre el problema.

LA CONTRACCION MUSCULAR

Observaciones hechas al microscópio electrónico han revelado que cuando el músculo se contrae, es un tercio más pequeño, pero el ancho de las bandas A, así como la distancia entre las bandas Z y la zona H se conservan. Además, la longitud de los miofilamentos gruesos y delgados tampoco cambia. Sin embargo, se aprecia que la anchura de la zona H disminuye, e incluso suele desaparecer. Esto ha permitido proponer el deslizamiento de los filamentos como el mecanismo de contracción muscular a nivel de la sarcómera, de tal manera que los puentes de los filamentos gruesos empujan a estos a través de los delgados como si fueran los remos de un bote en la superficie del agua. Además, al ocurrir el deslizamiento de los filamentos gruesos, las bandas Z se desplazan hacia la banda A con lo que se presenta el acortamiento de la sarcómera. En otras palabras, es el deslizamiento de los filamentos lo que acorta la sarcómera y esto genera, a su vez, la contracción de los músculos y, en consecuencia, el movimiento (Fig.4).

Si bien el deslizamiento de los filamentos produce el movimiento, es necesario explicar como es que esta función se acopla a una fuente energética, tal como la hidrólisis del ATP provee la energía requerida para que ocurra la contracción muscular (Fig.5). En un primer paso, el complejo de actina-miosina (actomiosina) se disocia y se libera la actina por efecto de la unión de ATP a la miosina. Posteriormente, ocurre la rápida hidrólisis del ATP y se llega a un estado de alta energía en donde la energía de la hidrólisis se conserva y tanto el ADP como el fosfato inorgánico (Pi) permanecen unidos a la miosina. Más tarde, la actina se une al complejo anterior y luego permite la liberación del Pi y del ADP, regenerándose así el complejo de actomiosina.

Con este esquema, es posible visualizar como ocurre el acoplamiento entre la hidrólisis del ATP y el deslizamiento de los miofilamentos. En principio, la unión del ATP a la cabeza S1 de la miosina (filamento grueso) libera de la unidad monomérica adyacente de actina (filamento delgado). Luego, la miosina hidroliza el ATP hasta lograrse un estado conformacional de alta energía, en el cual la cabeza S1 se encuentra en posición casi perpendicular al filamento delgado de actina. Posteriormente, el complejo de miosina-ADP-Pi se une a la unidad de actina adyacente, para permitir, más tarde, la liberación del Pi seguida del ADP de la cabeza S1 de miosina y el consecuente deslizamiento de los filamentos. Esta situación hace que las cabezas S1 de la miosina se inclinen unos 45° con respecto al disco Z vecino, hasta impulsar el filamento delgado unos 100 A° en dirección opuesta en relación al filamento grueso. De esta forma, la cabeza S1 regresa a su estado inicial para comenzar un nuevo ciclo, mismo que se lleva a cabo (unas cinco veces por segundo en una contracción fuerte) de manera asincrónica entre las aproximadamente 500 cabezas de cada filamento grueso, observándose como si las cabezas remararan a lo largo de los rieles de actina.

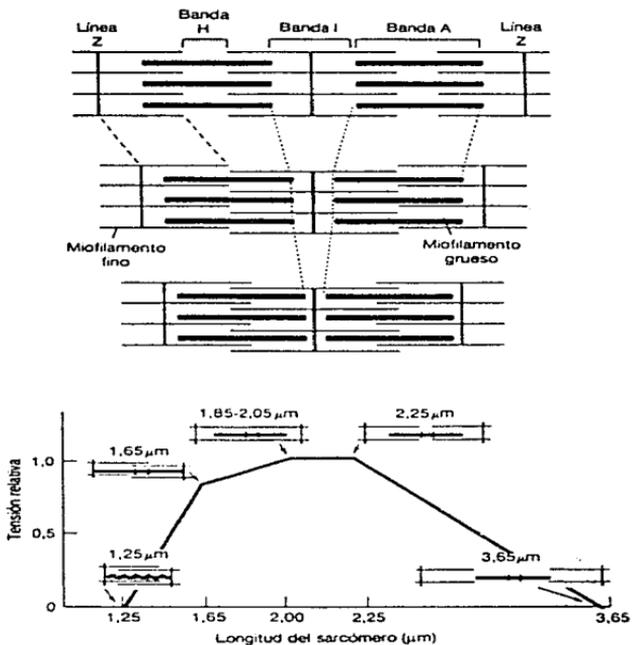


Fig.4. Secuencia del mecanismo de deslizamiento de los filamentos en la contracción muscular. Nótese el cambio de tamaño de la zona H. Tomada de Eckert y Randall, 1994.

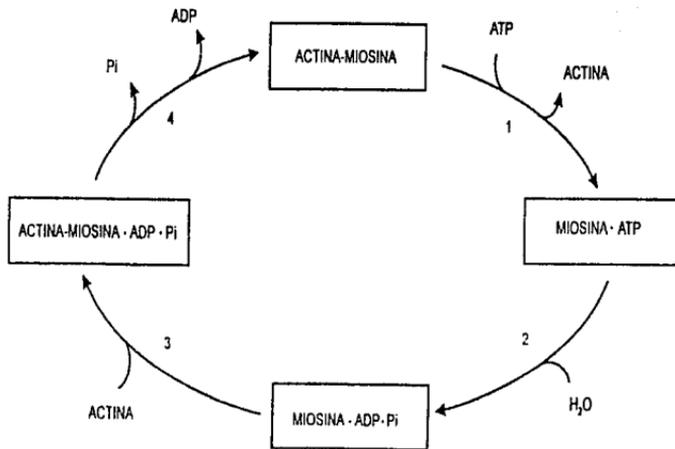
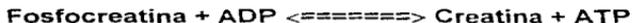


Fig.5. Esquema de la secuencia de la contracción muscular promovida por la hidrólisis del ATP en la sarcómera.

Ya se ha analizado la importancia del ATP en el suministro de energía para la contracción muscular. Sin embargo, si se considera que las cantidades de ATP halladas en el músculo sólo pueden proporcionar energía para una quinta parte de las contracciones que pueden tener efecto cuando la glucólisis (proceso metabólico que provee dos mol de ATP por uno de glucosa consumido) está inhibido con iodoacetato (inhibidor de la gliceraldehido-fosfato-deshidrogenasa) y, además, si se efectúa un cuidadoso análisis del contenido de ATP de los músculos, antes y después de una simple contracción, se demuestra que no hay disminución significativa en el contenido de ATP ni aumento en el ADP. Tales hechos sugieren que el ATP puede no ser la fuente directa de energía en la contracción muscular. Sin embargo, al considerar el papel de la fosfocreatina, descubierta en 1927 por C. Fiske y Y. Subbarow, que se encuentra cinco veces más concentrada que el ATP, se cuenta con un sistema que regenera rápidamente al ATP hidrolizado durante la contracción. La fosfocreatina presenta en su estructura un grupo fosfato unido directamente a un átomo de nitrógeno de un grupo guanido (Fig.6). Este grupo fosfato es transferido por acción de la creatina-quinasa al ADP:



$$\Delta G^{\circ} = -3 \text{ Kcal/mol}$$

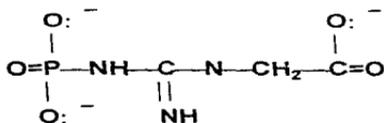


Fig. 6. Estructura de la Fosfocreatina.

Considerando el valor de ΔG° , se ve que el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la derecha -siempre que se parta de concentraciones 1M de los reactivos-. Si se inhibe la creatina-quinasa con 2,4-dinitrofenilo (reactivo de Sanger) y se estimula el músculo, se observa que el nivel de ATP disminuye y el de fosfocreatina permanece inalterado. De esta manera, se tiene una prueba de que es este nucleótido de adenina la fuente directa de energía para que la contracción muscular se lleve a cabo.

Es importante precisar que la energía metabólica para re fosforilar el ADP no es idéntica en todos los músculos y aunque todos cuentan con el proceso glucolítico y el de la oxidación fosforilativa, la contribución de cada uno puede variar considerablemente. Existen dos tipos de fibras musculares: las rojas o lentas y las blancas o rápidas. En las primeras, existe un gran contenido de mioglobina y citocromos -que confieren su color al tejido- y al contar con numerosas mitocondrias, es la oxidación fosforilativa el proceso utilizado como fuente principal de energía y de refosforilación del ADP. Los músculos rojos (como los voladores de las aves) se contraen más lentamente que los blancos y normalmente funcionan por ciclos periódicos regulares. Los músculos blancos, por su parte, contienen poca mioglobina y pocas mitocondrias; en estos músculos la glucólisis es la fuente principal de energía y de refosforilación. Algunos ejemplos de músculos blancos son los sartorios de las ranas, y los correspondientes a las patas traseras y la espalda baja del conejo.

Las velocidades de la glucólisis y de la oxidación fosforilativa, y en consecuencia la formación de ATP, se ajustan al ritmo de consumo de ATP por el músculo gracias a una serie de retrocontroles como el llamado Efecto Pasteur y la Carga Energética. Esta última será discutida más adelante con mayor detalle.

Además de las reacciones bioquímicas ya descritas y puesto que el músculo esquelético tiene la característica de ejercer su movimiento de manera voluntaria, es necesario que un impulso nervioso sirva de señal para que la contracción ocurra. Cuando la señal eléctrica llega a las invaginaciones del nervio en el músculo (placa neuromuscular), provoca la liberación de acetilcolina (neurotransmisor) que es reconocida por su receptor nicotínico -un receptor permeable al sodio- ubicado en la membrana plasmática (sarcolema) de las células musculares, ello conlleva al movimiento de iones Na^+ , primero a través de este canal y luego a través de los diferentes canales de sodio sensibles a voltaje ubicados a lo largo de la membrana. Esta movilización de sodio hacia el espacio extracelular implica una despolarización de la membrana. Paralelamente, también ocurre una hiperpolarización mediante la introducción de iones K^+ al interior celular. Este intercambio de iones genera un potencial de acción que se propaga por todo el sarcolema hasta las invaginaciones de los Túbulos T y es precisamente en la unión con las dos cisternas terminales (triada) del retículo sarcoplásmico pesado (RSP) que la señal eléctrica se convierte en una señal química. El mecanismo exacto, denominado acoplamiento excitación-contracción, de cómo ocurre esta transducción de señales no ha sido aclarado (Caterrall, 1991; y referencias incluidas). Sin embargo, se sabe que los tubulos T presentan una gran abundancia de canales de calcio denominados receptores de dihidropiridina (DHPR), los cuales, a diferencia de lo que ocurre en el corazón, no funcionan como canales en el músculo esquelético, sino que actúan como sensores de voltaje acoplados a otro canal liberador de calcio que presenta una gran afinidad por un alcaloide de

origen vegetal conocido como ryanodina. De ahí el nombre de receptor de ryanodina (RyR). Al parecer, el movimiento de carga de la subunidad $\alpha 1$ (175 kd) del DHPR propicia un cambio conformacional que se propaga directamente al RyR, dando lugar a que éste último se active y permita la liberación de calcio hacia el citoplasma celular. En 1970, Franzini-Armstrong, mediante microscopía electrónica, identificó una serie de zonas de alta densidad electrónica en forma de "pies" (Fig.7) que unían a las cisternas terminales del RSP con los tubulos T. Posteriormente se identificaron a estas estructuras como el dominio citoplasmático del RyR (Fleischer et al., 1985; Meissner, 1986).

Además de la propuesta de interacción directa del segmento que une a los dominios II y III de la subunidad $\alpha 1$ del DHPR, se ha sugerido que el acoplamiento puede ocurrir a través de una proteína adicional de 95 kD.

Es importante aclarar que existen evidencias que sugieren que en el músculo esquelético existe un exceso de RyR respecto al de DHPR, por lo que se cree que aproximadamente la mitad de los RyRs liberan calcio por interacción directa con el DHPR y la otra mitad trabaja la liberación de calcio inducida por calcio.

En contraste con la situación anterior, en el corazón y en el músculo liso la liberación de calcio ocurre por un mecanismo diferente conocido como liberación de calcio inducida por calcio; esto significa que cuando ocurre una despolarización de la membrana plasmática, los DHPRs que son sensibles al voltaje se abren y permiten la entrada de calcio procedente del exterior celular por lo que se incrementa la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y ello provoca la liberación de calcio por parte del retículo sarcoplásmico. En el corazón, al igual que en el músculo esquelético el RyR es el encargado de la liberación del calcio al citoplasma, mientras que en el músculo liso esta responsabilidad se comparte con el receptor de 1,4,5-Inositoltrifosfato (IP_3R), que también es un canal liberador de calcio, pero que es sensible al IP_3 proveniente de otro precursor, el Fosfatidilinositol 4,5-Bisfosfato (PIP_2) que a su vez es generado por señales hormonales que llegan a la membrana plasmática. En el corazón el IP_3R sólo se encuentra en células especializadas como las marcapaso.

Por la estructura primaria y otras observaciones bioquímicas (Furuichi et al., 1989) se sabe que el IP_3R es un homotetrámero homólogo al RyR, que presenta otras isoformas (Wojcikiewicz, et al., 1995) y que puede ser modulado alostericamente por diferentes efectores como los nucleótidos de adenina (Ferris et al., 1990).

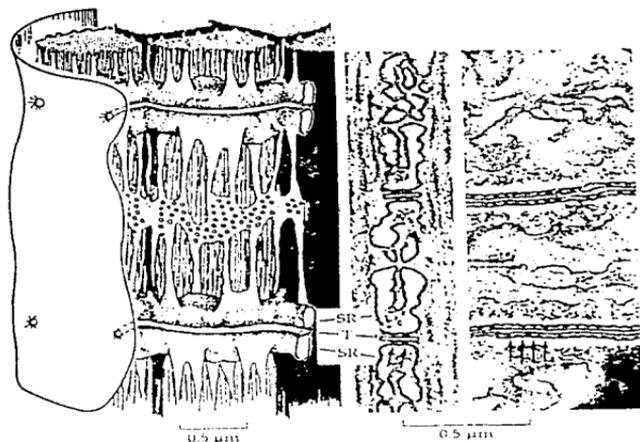


Fig.7. Esquema y micrografía electrónica de un corte transversal donde los receptores de ryanodina ("pies") se señalan con flechas en ambos lados de los Túbulos T. Tomadas de Hill, 1992.

Hasta aquí se ha descrito la contracción muscular como un conjunto de procesos bioquímicos y eléctricos que permite el movimiento. Como muchos otros fenómenos biológicos, la contracción muscular también puede ser regulada. Esta regulación está relacionada con la $[Ca^{+2}]_i$, la cual, a su vez, es el producto del flujo de calcio a través de canales membranales, de la actividad de bombas e intercambiadores de calcio en la membrana plasmática y/o de la captura o la liberación de calcio en reservorios internos como el retículo endoplásmico y la mitocondria.

El papel del calcio en la regulación de la contracción muscular es el de unirse a la troponina C que forma un complejo con la tropomiosina, esta última al estar unida a lo largo de los surcos del filamento delgado en el músculo relajado, bloquea la unión de las cabezas S1 de la miosina. Estudios de difracción de rayos X han revelado que cuando la $[Ca^{+2}]_i$ alcanza un nivel crítico, ocurre una interacción alostérica entre el complejo calcio-troponina C y la tropomiosina, de tal forma que esta última se desplaza aproximadamente 10 Å hacia dentro del surco del filamento delgado de actina, descubriendo los sitios de unión de la miosina en la actina y activando la contracción muscular (Fig.8). Este mecanismo puede ser cooperativo en el sentido de que la unión de la cabeza de miosina S1 a una subunidad de la actina puede empujar a la tropomiosina lejos de la vecindad del sitio de unión de la miosina en un cambio conformacional que puede también incrementar la afinidad de la troponina C por el calcio.

Es importante mencionar que la importancia del calcio como modulador metabólico se extiende también a la regulación de procesos tan complejos como la liberación de neurotransmisores, o a su acción como segundo mensajero para distintas enzimas de relevancia en la bioquímica celular, tales como fofolipasas, proteínas quinasas, calmodulina, calpains (proteasas), etc. (Fig.9) (Nicholls *et al.*, 1992).

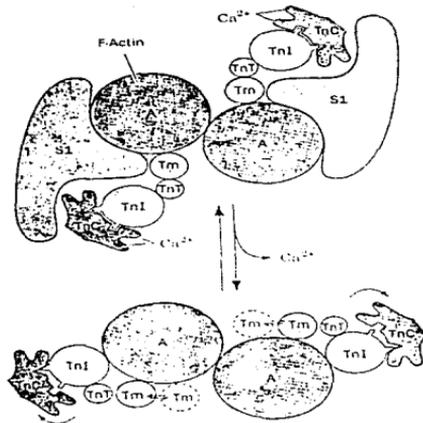


Fig.8. El calcio como regulador de la contracción muscular. Cuando el calcio se une a la Troponina C (TnC), le provoca un cambio conformacional que se extiende por las troponinas (TnI, TnT) y la tropomiosina (Tm) hasta permitir que la cabeza de miosina (S1) entre en contacto con la F-Actina para que ocurra el desplazamiento de los miofilamentos. Cuando no hay calcio, las troponinas y la tropomiosina impiden el contacto entre la miosina y la actina. Tomada de Voet y Voet, 1990.

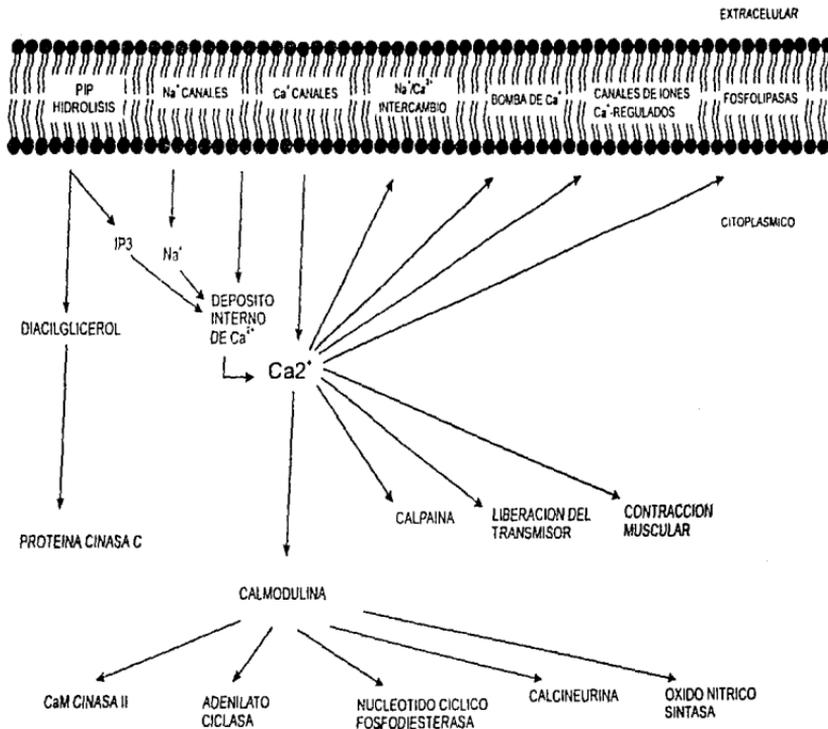


Fig.9. Esquema de las diferentes acciones que ejerce el Ca^{2+} en los sistemas vivos.

El Receptor de Ryanodina (RyR)

Ya se ha discutido la importancia del calcio en la contracción muscular y la manera en que las señales eléctricas son transducidas. Sin embargo, es necesario profundizar la discusión respecto al papel que desempeña el RyR en ambos sucesos, pero antes es conviene abrir un paréntesis para explicar ¿qué es y cuál es la función del RyR?

Anteriormente se mencionó que el RyR recibe su nombre debido a la gran afinidad que presenta por un alcaloide llamado ryanodina (Ryanodol 3-[1H-pirrol-2-carboxilato]) (Fig.10), el cual fué aislado en 1948 por E.F. Rogers y su estructura fué determinada en 1965 por D.R. Rabbín y col. y J. Santroch y col. Este alcaloide es soluble en agua, en etanol y en cloroformo y es prácticamente insoluble en benceno y eter de petróleo (Index Merck, 1989). La ryanodina se extrae de un árbol (*Ryania speciosa Vahl*, fam. Flacourtiaceae), originario de la región tropical del continente Americano (Sleumer, 1980).

El RyR es una proteína homotetramérica constituida por 5037 aminoácidos y de 450-500 kD de peso molecular por subunidad. Forma un canal iónico, cuya función es la de liberar iones calcio de compartimentos internos hacia el citoplasma de la célula. Algunos autores afirman que el dominio transmembranal del RyR consta de cuatro segmentos que atraviezan la membrana (Takeshima *et al.*, 1989 y Hakamata *et al.*, 1992) y otros afirman que son al menos diez (Sorrentino y Volpe, 1993; Serysheva *l.l.* et al, 1995); los cuales se combinan para formar el poro por donde permean los iones calcio. Ambas posturas coinciden en que estos segmentos transmembranales se ubican hacia el extremo carboxiterminal del RyR.

Se han reportado tres diferentes genes que codifican para el RyR. Los distintos tipos de RyR se distribuyen en diversos tejidos. El RyR₁ se encuentra en mayor proporción en el músculo esquelético, el RyR₂ en el corazón y el cerebro y el RyR₃ se distribuye, en proporciones muy discretas, tanto en los tejidos anteriores como en el estómago, los pulmones y aún se discute si también se encuentra en el hígado. El RyR de músculo esquelético y el de corazón presentan regiones con una alta homología y tres zonas llamadas de divergencia (Fig.11). La primera zona de divergencia (D1) se encuentra entre los aminoácidos 4254-4631 para el RyR de músculo esquelético y 4210-4562 para el RyR cardíaco. Esta región incluye la asa intraluminal entre los dominios transmembranales 3 y 4 (TM3 y TM4) y la gran región citoplasmática comprende los dominios TM4 y TM5. La D2 se encuentra entre los aminoácidos 1342-1403 para el esquelético y 1353-1357 para el cardíaco. La D3 se ubica entre los aminoácidos 1872-1923 para la secuencia esquelética y 1852-1890 para la cardíaca. Estas áreas pueden corresponder a dominios regulatorios responsables por las diferentes propiedades de ambos tipos de RyR. Es interesante señalar

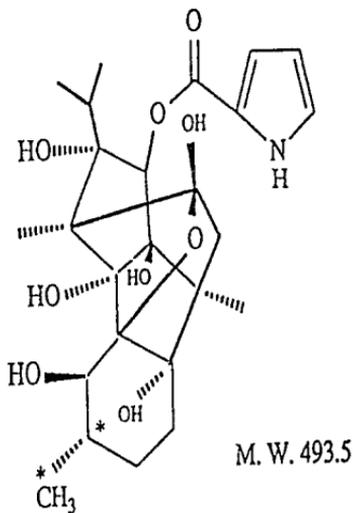
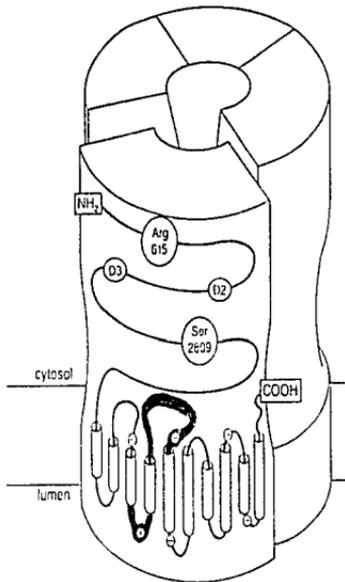


Fig.10. Estructura de la Ryanodina. Los asteriscos indican las posiciones en donde se sustituyen átomos de hidrógeno por átomos de tritio.

Fig.11. Esquema del canal liberador de calcio, RyR. El número de segmentos transmembrales es tentativo. Las zonas marcadas como D1 (asas sombreadas), D2 y D3 corresponden a las zonas de divergencia entre el RyR de músculo esquelético y el cardíaco. Vease más adelante en el texto. La ser 2809 es el único sitio de fosforilación en el RyR cardíaco. Cuando ocurre una mutación en la arg 615 del RyR muscular por una Cys, tiene lugar la enfermedad conocida con hipertermia maligna. Tomado de Sorrentino y Volpe, 1993.



que los genes que codifican para el RyR₁ y el RyR₂ generan proteínas con un 66% (75% cuando los reemplazos conservados son tomados en cuenta) de homología entre sí (Sorrentino y Volpe, 1993).

Ya se ha dicho que el RyR₁ es el canal liberador de calcio que está presente en mayor proporción en el músculo esquelético. Sin embargo, debe precisarse que su ubicación se remite a la membrana del RSP, es decir en la triada, ahí donde se realiza el acoplamiento de excitación-contracción con el DHPR, discutido previamente. En lo sucesivo, se hará referencia al RyR₁ simplemente como el RyR. No obstante de las diferencias genéticas, los otros tipos de RyR también muestran propiedades similares.

Además de un dominio transmembranal, el RyR también presenta un dominio orientado hacia el lumen del RSP donde se ubica el sitio con el interactúa con la calsecuestrina que es una proteína que -como su nombre lo indica- "secuestra" o retiene el calcio en el interior del compartimento; y otro muy grande orientado hacia el citoplasma. En este último, se encuentra tanto el extremo N-terminal (aminoácidos 2-15) como el C-terminal (aminoácidos 5027-5037) (Marty *et al.*, 1994), así como diferentes sitios regulatorios para diferentes moléculas; es decir que su condición de canal iónico le confiere al RyR características propias de este tipo de macromoléculas (Butanda *et al.*, 1996), entre ellas está su capacidad para ser modulada alostéricamente. Entre los sitios de reconocimiento ubicados en este dominio citoplasmático se encuentran los de calcio y rojo de rutenio. De hecho, se sugiere que la secuencia de aminoácidos del 4478 al 4512 puede estar involucrada en la liberación de calcio inducida por calcio (Wayne *et al.*, 1992), proceso que, aparentemente, se lleva a cabo paralelamente a la excitación-contracción que también permite la liberación de calcio. Además, estos sitios están colocalizados con los de calmodulina (Wayne *et al.*, 1994).

Dentro de la discusión sobre la modulación alostérica del RyR, es esencial particularizar sobre el doble efecto que ejerce la ryanodina sobre su receptor. A concentraciones de entre 10 y 50 nM, este alcaloide provoca que el canal se abra (activación) y libere calcio, y a concentraciones de entre 10 y 300 µM, provoca el cierre (inhibición) del canal (Fleisher e Inui, 1989). De hecho, esta situación explica la toxicidad de la ryanodina; es decir, que puede provocar una contracción muscular sostenida o bien inhibirla.

En 1990 Chu *et al.* demostraron que la unión específica de la [³H]-ryanodina sirve como una prueba del estado funcional de su receptor, de tal manera que, al trabajar a concentraciones al rededor de la constante de disociación (K_d = 7.94 nM), esto es en la región lineal de la curva de saturación; si se provoca la apertura del canal por medio de algún agente activante, se observa que la unión específica del receptor con la ryanodina aumenta y, por el contrario, si se inhibe el receptor, entonces se aprecia una disminución de la

unión específica. Si se utilizan concentraciones de trabajo intermedias a las ya descritas, se observa un estado intermedio de conductancia.

Continuando con la modulación alostérica del RyR, debe decirse que su gran tamaño le permite contar con numerosos sitios de reconocimiento para diferentes sustancias. Existe una lista (Fleisher e Inui, 1989) muy considerable - que año con año se incrementa- de diferentes moduladores que interactúan con esta proteína. Algunos de interés farmacológico y otros de importancia fisiológica. Entre los primeros se encuentran, por ejemplo el ya mencionado rojo de rutenio, la procaina, el dantroleno, la neomicina (inhibidores), la cafeína, el halotano, la doxorubicina (activadores), etc.; y entre los segundos se encuentran el Mg^{+2} , la calmodulina (inhibidores), el Ca^{+2} , los nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) (activadores), etc. El RyR también puede ser regulado y/o estabilizado por asociación directa con otras proteínas como la inmunofilina FK-506 (Brillantes *et al.*, 1994) o la sorcina, que también reconoce iones calcio (Meyers *et al.*, 1995).

Además de los ejemplos anteriores, el RyR también puede ser modulado por algunas de las modificaciones covalentes que comúnmente presentan los canales iónicos (Butanda *et al.*, 1996). En este sentido, el RyR puede ser fosforilado y/o estar sujeto a cambios funcionales según su estado redox. En este caso la fosforilación ocurre por proteínas cinasas como la proteína cinasa A exógena dependiente de cAMP (PKA) o la proteína cinasa II dependiente de calmodulina (CaIPKII). Ambas contrarrestan la inhibición del canal cuando hay Mg^{+2} presente, permitiendo la apertura del RyR, pero exhiben dos diferentes estados de fosforilación. Si el canal es desfosforilado por la proteína fosfatasa 1 (PPT1), se puede revertir el efecto de las cinasas y entonces, el canal se hace susceptible a la inhibición por Mg^{+2} . Si por el contrario, el RyR es fosforilado, por la proteína quinasa endógena dependiente de calmodulina (endCAIPK), ocurre el cierre del canal. Este efecto puede revertirse con ayuda de la PPT1 ó con la CaIPK (Hain *et al.*, 1994). Se sabe, además, que el RyR también puede ser fosforilado por proteínas cinasas asociadas a la membrana utilizando ATP endógeno o exógeno como fuente de fosfatos (Herrman-Frank y Varsányi, 1993). Existen otras proteínas cinasas que fosforilan al RyR, pero mientras que el RyR de músculo esquelético es fosforilado en la serina 2843 (Suko *et al.*, 1993), el RyR cardíaco es fosforilado en la serina 2809 (Witcher *et al.*, 1991). Aparentemente, ambos sitios son ligeramente diferentes entre sí, ya que mientras el del RyR de músculo esquelético puede ser fosforilado por las proteínas cinasas dependientes de c-AMP (PKA), de c-GMP (PKG) y de calcio/calmodulina (PKCaM); el sitio del RyR cardíaco prefiere ser fosforilado por la PKCaM.

Como en muchas otras proteínas, el equilibrio entre la forma oxidada y la forma reducida de los grupos tiol de las cisteínas (-S-S- y -SH, respectivamente) hace que el RyR esté sujeto a modificaciones funcionales según el estado redox

imperante; así por ejemplo, se ha observado que la oxidación de los grupos sulfhidrilo provoca una rápida liberación de calcio en vesículas de retículo sarcoplásmico (Trimm *et al.*, 1986), también se ha visto que a concentraciones milimolares de H_2O_2 , que es un generador de radicales libres y un fuerte oxidante, se induce la liberación de calcio e incrementa la afinidad en la unión específica de la [3H]-ryanodina, es decir que el canal se activa (Favero *et al.*, 1995). Este equilibrio redox también permite que el RyR interaccione funcionalmente con otras proteínas como la triadina (una glucoproteína), lo cual involucra, en parte, la ciclicación redox de grupos sulfhidrilo hiperreactivos en respuesta a la activación o inhibición del canal (Liu y Pessah, 1994). Además, existen reportes (Abramson *et al.*, 1983; Salama y Abramson, 1984) en donde se muestra que, bajo ciertas condiciones y a concentraciones micromolares, iones metálicos como Cu^{+2} , Ag^+ y Hg^{+2} , también inducen una rápida liberación de calcio en el retículo sarcoplásmico. Sin embargo, se ha observado que en ensayos de unión específica con ryanodina, la afinidad del RyR por este alcaloide disminuye, lo cual sugiere que estos metales pesados provocan una inhibición del canal (Martinez-Merlos y Diaz-Muñoz, datos no publicados).

CARGA ENERGETICA (CE) Y LA MODULACION DEL RYR POR NUCLEOTIDOS DE ADENINA Y OTROS DERIVADOS DE PURINA

Anteriormente, se mencionó que los nucleótidos de adenina modulan la actividad del RyR. Los trabajos que se han realizado con estas moléculas muestran que el ATP, el ADP y el AMP activan al canal. También se han probado análogos no hidrolizables de estos nucleótidos y se han observado los mismos resultados (Fleisher e Inui, 1989).

No obstante, el enfoque que estos trabajos ofrece no va más allá de la respuesta farmacológica del RyR, ya sea a estos nucleótidos *per se*; o bien, al uso de éstos para caracterizar la respuesta del RyR frente a diferentes condiciones de trabajo tales como pH, fuerza iónica, etc. En otras palabras, no se ha considerado que bajo condiciones fisiológicas, estos nucleótidos se encuentran al mismo tiempo, y no separados, en el interior celular. La proporción en que los nucleótidos de adenina se encuentran en la célula fué definida por Daniel Atkinson (1977) y la llamó Carga Energética (CE). Esta es, en esencia, la suma de la fracción mol del ATP más la mitad de la fracción, mol del ADP:

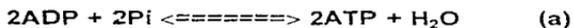
$$CE = \frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Más que una simple expresión de proporciones, la carga energética encierra dentro de sí, un concepto de regulación metabólica y energética para la célula; es decir que, dado que al hidrolizar un grupo fosfato del ATP se libera la energía suficiente para dar lugar a los diferentes procesos metabólicos:



$$\Delta G^\circ = -7.6 \text{ Kcal/mol}$$

la interconversión de este nucleótido en sus productos de hidrólisis (ADP y AMP) genera un estado energético para la célula tal, que le permite responder a situaciones en donde se requiera restaurar el nivel energético, o bien, en donde se requiera utilizarlo. Para explicar ésto, considerense los siguientes equilibrios:



La reacción (a), representa la interconversión entre el ADP y el ATP catalizada, por ejemplo, por alguna enzima cinasa o por la H^+ -ATPasa en la fosforilación oxidativa. La reacción (b), ocurre debido a la acción de la adenilato cinasa. Al sumar las dos reacciones anteriores se obtiene (c).

Al igual que en una celda voltáica, si se introduce una corriente de electrones, la energía de la celda se incrementa. De la misma manera, si en el sistema celular se incrementa la concentración de ATP, entonces se incrementa también la energía disponible para desarrollar las diferentes funciones celulares. Si por el contrario se disminuye esta disponibilidad, es decir que disminuye la concentración de ATP y aumenta la de AMP, entonces el nivel energético de la célula también disminuye. Con esta idea, aparentemente, el ADP queda excluido de la regulación; sin embargo, hay que observar que un mol de ADP es utilizado para producir $\frac{1}{2}$ mol de ATP, de ahí que sólo contribuya con la mitad de su fracción mol en la expresión de la CE.

La CE, es un valor definido para todos los sistemas vivos, es de alrededor de 0.9 y cualquier variación de éste, provoca una serie de cambios metabólicos cuyo propósito es el de reestablecer dicha proporción. La Fig.12, ilustra esta situación. La curva marcada como R, representa la respuesta de aquellas enzimas que participan en los procesos que regeneran el nivel de ATP (rutas catabólicas) y la curva marcada como U, representa la respuesta de aquellas enzimas que participan en rutas donde se utiliza ATP (anabólicas). En situaciones donde se experimenta una disminución de la CE, por ejemplo al someterse a un ejercicio exhaustivo (Schulte *et al.*, 1992), las rutas que regeneran el nivel de ATP son aceleradas mediante la respuesta de sus enzimas reguladoras. Al mismo tiempo, las rutas que lo utilizan se hacen más lentas.

Además de las situaciones de estrés metabólico ya mencionadas, existen otros reportes en los que también se observa una disminución de la CE al profundir tejido hepático durante 1h con D-fructosa (Woods *et al.*, 1970).

Por el contrario, si ocurre un aumento de la CE, por ejemplo al inyectar adenosina (Chagoya de Sánchez *et al.*, 1972), se producen los cambios inversos. En otras palabras, el sistema ATP-ADP-AMP se ve impulsado así, a actuar óptimamente en un estado estacionario en el que la CE es igual a 0.9 y por lo regular, resiste fuertemente a cualquier desviación del mismo.

Si se analiza la estructura de los nucleótidos de adenina (Fig.13) se puede distinguir tres secciones: un anillo de adenina, un anillo de ribosa y de uno a tres grupos fosfatos. Si se descartan estos últimos, lo que se obtiene es la estructura de la adenosina (ADO) que puede generarse en la célula como producto intermedio en la degradación de los nucleótidos de purina (Fig.14). Además, la ADO es capaz de regular el flujo sanguíneo en el sistema cardiovascular, de actuar como neurotransmisor en el sistema nervioso central y como modulador del metabolismo hepático y del tejido adiposo, así como de la respuesta inmune. De hecho se ha demostrado su potencial terapéutico en desórdenes psiquiátricos y hepáticos (Chagoya de Sánchez, 1994).

Reiteradamente se ha dicho que los nucleótidos de adenina modulan al RyR. Ahora bien, la similitud estructural entre dichos nucleótidos con la ADO, han permitido extender este estudio para determinar si el RyR es también capaz de reconocer y, consecuentemente, de ser modulado por la ADO y por otros derivados de purina, como por ejemplo, los diferentes intermedarios (INO=inosina, HIPO=hixantina, XAN=xantina, AU=ácido úrico) del catabolismo de aquella primera.

En algunos vertebrados, incluidos los primates, el perro dalmata, las aves y algunos reptiles, el producto de la degradación de las purinas es el ácido úrico, de ahí el adjetivo de animales uricotélicos; mientras que en otros mamíferos y

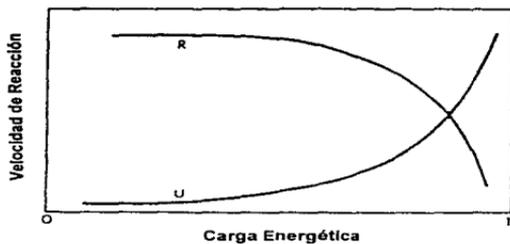


Fig.12. Respuesta de los sistemas enzimáticos a las variaciones de la carga energética (C.E.), donde R representa a las rutas que regeneran ATP y U representa a las rutas que utilizan ATP. Tomada de Atkinson, 1977.

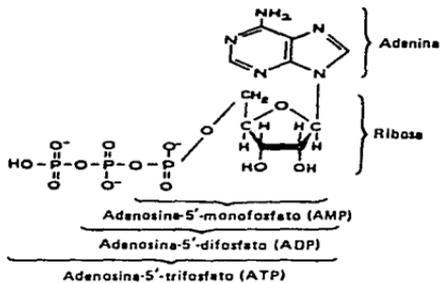


Fig.13. Estructura de los nucleótidos de adenina: ATP, ADP y AMP. Tomada de Martín et al. 1984.

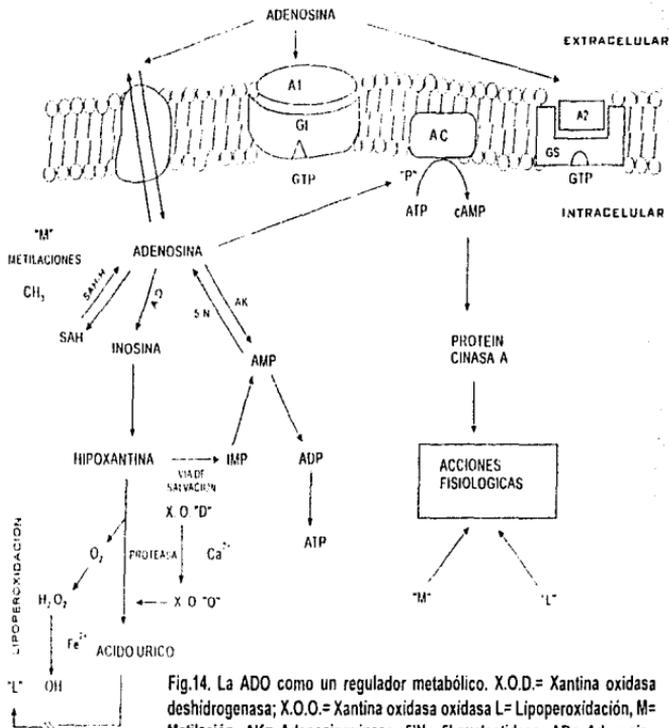


Fig.14. La ADO como un regulador metabólico. X.O.D.= Xantina oxidasa deshidrogenasa; X.O.O.= Xantina oxidasa oxidasa L= Lipoperoxidación, M= Metilación, AK= Adenosinquinasa, 5'N= 5'-nucleotidasa, AD= Adenosina deaminasa SAH-H= S-adenosilhomocistein hidrolasa, AC= Adenilato Ciclasa, A1 y A2= Receptores purinérgicos, G= Proteínas G. Tomada de Chagoya de Sánchez, 1995.

reptiles, así como en los moluscos, el producto final es la alantoina. En los peces, la alantoina es degradada hasta ácido alantóico y urea.

ASPECTOS TEORICOS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA ADO Y SUS CATABOLITOS COMO FACTOR RELEVANTE EN SU ACTIVIDAD FRENTE AL RyR

Al revisar las estructuras moleculares de los catabolitos de la ADO (Fig.15), se observa que las diferencias entre ellos se remiten a su estado de oxidación y/o a la presencia del anillo de ribosa unido covalentemente en posición β -glicosídica al N9 del anillo purínico. Tales diferencias deben repercutir en la distribución de sus electrones, lo cual, a su vez, debe provocar cambios en la manera en como estas purinas interactúan con el RyR. Es decir, que al determinar la orientación de la densidad electrónica podrá conocerse la forma en que las moléculas se orientan para interaccionar con la proteína. A la fecha existe toda una metodología conocida como QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) en donde se correlacionan parámetros estructurales con la actividad de diferentes sustancias (Ward, D.J. et al. 1991). En 1982 Olsson utilizó el vector μ en un modelo que pretendía explicar la interacción de la ADO y otros derivados de purina con el receptor purinérgico de músculo liso.

Una forma de conocer como los cambios estructurales antes mencionados alteran la distribución de los electrones en las moléculas, es mediante el cálculo del vector momento dipolar (μ). Dentro de la gran variedad de cálculos teóricos (Löwdin *et al.* 1991) se encuentran los *ab-initio* -los más elaborados-, en los que se consideran todos los átomos y todos los electrones de la molécula calculando rigurosamente todos los términos en las ecuaciones y los cálculos semiempíricos -menos complicados-, en los cuales se utilizan valores obtenidos experimentalmente y se consideran sólo los electrones de valencia de cada átomo para realizar el cálculo.

Para calcular la energía total de una molécula (Cruz-Garriz *et al.* 1986) puede aplicarse un operador conocido como Hamiltoniano (H) a la función de onda (Ψ) de la molécula de interés. El resultado que se obtiene es la misma función de onda, pero multiplicada por una constante (E) que corresponde al valor de la energía total (energía potencial + energía cinética). Lo anterior se representa como:

$$H\Psi(r_1\dots r_n, R_1\dots R_m) = E\Psi(r_1\dots r_n, R_1\dots R_m)$$

donde r y R representan las coordenadas de los electrones y de los núcleos, respectivamente.

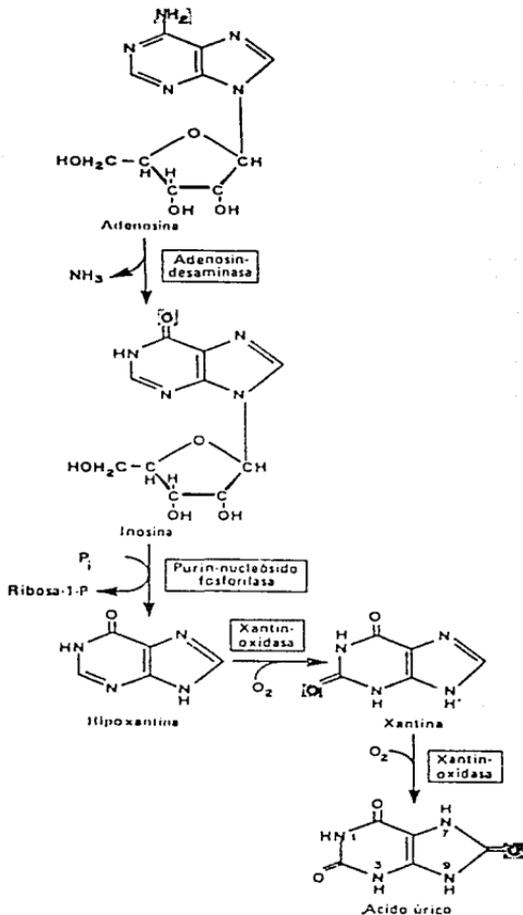


Fig. 15. Ruta catabólica de la ADO., tal como sucede con los animales urotélicos. Tomada de Martin et al. 1984.

Una ecuación como la anterior, se denomina ecuación de valores propios del operador -en este caso H-, en la que E (la energía total) es el valor propio de H y Ψ la función propia de H. Por lo tanto, resolver una ecuación de valores propios implica encontrar todas las funciones Ψ que se convierten en sí mismas, al aplicar el operador, pero multiplicadas por una constante.

La operación que ordena la aplicación de H sobre Ψ , consiste en sumar la energía cinética total (T^{total}) de los electrones más la energía potencial total (V^{total}) de los electrones y de los núcleos. La primera corresponde a la segunda derivada de Ψ con respecto a las direcciones x,y,z multiplicada por menos el cuadrado de la constante de Planck ($h = 6,62618 \times 10^{-34}$ J/s) entre el producto de $(2\pi)^2 \times 2m$, (donde m es la masa del electrón, $m_e = 9.10953 \times 10^{-31}$ Kg); y la segunda se considera como un operador multiplicativo, pues depende sólo de la posición, esto es:

$$T^{\text{total}} = \sum_i^n T_i$$

$$V^{\text{total}} = V(\mathbf{r}_1 \dots \mathbf{r}_n, \mathbf{R}_1 \dots \mathbf{R}_n)$$

por lo que

$$H(\mathbf{r}_1 \dots \mathbf{r}_n) = T^{\text{total}} + V^{\text{total}}$$

queda como

$$H = [-(h^2/8\pi^2) \sum_i^n [\partial^2/\partial x_i^2 + \partial^2/\partial y_i^2 + \partial^2/\partial z_i^2] + V(\mathbf{r}_1 \dots \mathbf{r}_n, \mathbf{R}_1 \dots \mathbf{R}_n)]$$

De esta manera se tiene que

$$H\Psi = E\Psi$$

puede escribirse como

$$[-(h^2/8\pi^2) \sum_i^n [\partial^2/\partial x_i^2 + \partial^2/\partial y_i^2 + \partial^2/\partial z_i^2] + V(\mathbf{r}_1 \dots \mathbf{r}_n, \mathbf{R}_1 \dots \mathbf{R}_n)] \Psi = E\Psi$$

En este caso, los núcleos se consideran como fijos (aproximación de Born-oppenheimer).

Es importante aclarar que una ecuación de onda como la anterior es muy complicada de resolver, sobre todo para sistemas polieletrónicos. Por ello, se utilizan métodos de aproximación entre los cuales se encuentra el uso de un

determinante (determinante de Slater) que permita proponer una Ψ_{aprox} cuyos elementos son los diferentes orbitales moleculares que describen al sistema (en este caso una molécula). El uso de este determinante asegura que la Ψ_{aprox} cumple el principio de exclusión de Pauli .

Para lograr la mejor correspondencia entre la función de onda real y la aproximada debe escogerse los orbitales moleculares que mejor describan al sistema, para lo cual se requiere minimizar la energía esperada del sistema, manteniendo la función de onda normalizada. Esta condición conlleva a las ecuaciones de Hartree-Fock, que describen a un electrón y en cuyo operador están contenidas todas las interacciones (cinéticas, electrostáticas, etc.) que experimenta un electrón en el sistema. En otras palabras, las nuevas ecuaciones de Hartree-Fock presentan una forma similar a la ecuación de onda de Schrödinger, pero ahora sólo describe a un sólo electrón en el campo promedio de los demás electrones, esto es:

$$F\Phi_i(\mathbf{r}) = e_i\Phi_i(\mathbf{r})$$

donde F es el operador Hartree-Fock que se actúa sobre la función de onda del electrón i ésimo (Φ_i) del sistema el cual posee una energía e_i . Cada una de estas Φ_i se introduce en el determinante de Slater. Una mejor aproximación de Hartree-Fock se obtiene al considerar Ψ'_{aprox} como una combinación de muchos determinantes de Slater.

Si el sistema que se maneja es sencillo la resolución de la ecuaciones de Hartree-Fock puede abordarse mediante cálculos *ab-initio*, pero si es complejo, como las purinas, entonces los cálculos semiempíricos son más recomendables, por ejemplo el conjunto de métodos de la familia MNDO, PM3 y/o AM1.

Existen diversos programas para realizar cálculos semiempíricos, entre ellos se encuentra MOPAC, con el que además de obtenerse la energía de la molécula, se calcula las coordenadas del vector μ ; a partir de las cuales puede conocerse la dirección y la magnitud de dicho vector. Además, mediante la ayuda de otro programa (SYBYL), puede lograrse, al mismo tiempo, la representación gráfica de la estructura de la molécula y el vector μ , con lo que el análisis de la información resulta más sencillo y directo.

Además del vector μ , los cálculos semiempíricos realizados proveen muchas otras propiedades cuánticas de las moléculas, entre ellas se encuentra un parámetro de reactividad relacionado con la energía que se requiere para excitar los electrones en los orbitales frontera. Es decir, cada molécula puede representarse mediante orbitales moleculares, de los cuales son de particular

interés el orbital más alto (energéticamente) ocupado por electrones conocido como HOMO (The Highest Occupied Molecular Orbital) y el orbital molecular más bajo desocupado o LUMO (The Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Ambos son conocidos como orbitales frontera. La diferencia de energía entre ambos orbitales se ha utilizado como parámetro de reactividad (Fig.16). Entre menor sea esta diferencia (como en las moléculas con dobles enlaces alternados o conjugados) más sencillo será excitar los electrones en la frontera y, consecuentemente, la molécula será más reactiva.

SITIOS DE RECONOCIMIENTO DE ATP EN EL RyR

Otro aspecto que se deriva del estudio de la interacción de las diferentes purinas, ya descritas, con el RyR, se refiere a la búsqueda de secuencias concenso que reconozcan a este tipo de moléculas. Por ejemplo, la comparación con la secuencia primaria de la proteína p21, producto de un oncogen cuya estructura tridimensional ya se conoce (Krengel *et al.* 1990), ha permitido proponer, al menos, cinco sitios de reconocimiento para ATP en el RyR. Aún no se ha determinado si esos sitios también pueden reconocer a otras purinas. Así pues, se sabe (Wierenga y Hol, 1983) que la proteína p21 reconoce al ATP mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (consenso o motivo de ATP): GlyX*GlyX**X***Gly (donde X*, X** y X*** pueden ser Asn, Ala, Val, Gly, Leu, Pro, etc., indistintamente). En donde la primera y la tercera Gly permiten formar una asa entre la primera hoja β y la primera hélice α del extremo N-terminal. La segunda Gly permite una cercanía suficiente entre el pirofosfato del ATP y el extremo N-terminal de la proteína. Este motivo se encuentra en diferentes sitios (699-706, 1195-1200, 2370-2375, 4449-4454, 4602-4607) del receptor (Zarka y Shoshan-Barmatz 1993), de ahí que se hayan propuesto como posibles sitios que reconocen ATP en este canal liberador de calcio. Además del motivo de Gly, es necesaria la presencia de un aminoácido con carga negativa (Asp ó Glu) que permita formar puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo unido al C2' del anillo de ribosa (Fig.17).

Un ejercicio que podría arrojar indicios para responder esta pregunta sería predecir la estructura secundaria para cada uno de los sitios de reconocimiento propuestos para el RyR y comparar los resultados con la estructura de la proteína P21. Si las estructuras predichas resultasen similares con respecto a la de P21, entonces podría sugerirse que los sitios propuestos para el receptor reconocen, al menos, ATP.

La predicción de la estructura secundaria de una proteína se basa en el trabajo de Peter Y.Chou y Gerald D. Fasman (1974), en el cual, utilizando unas 15 proteínas de estructura conocida e inspeccionando la frecuencia con que sus

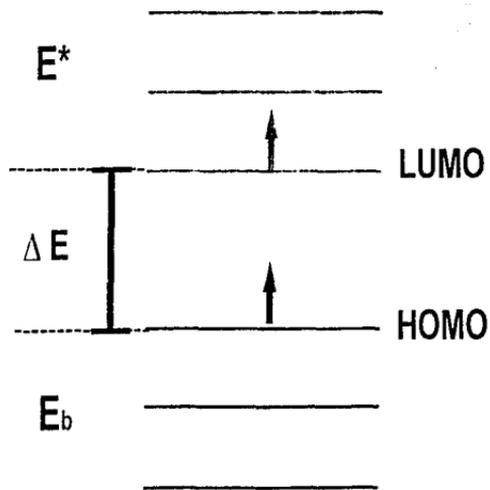


Fig. 16. Diagrama que ilustra la diferencia de energía (ΔE) entre el HOMO y el LUMO.

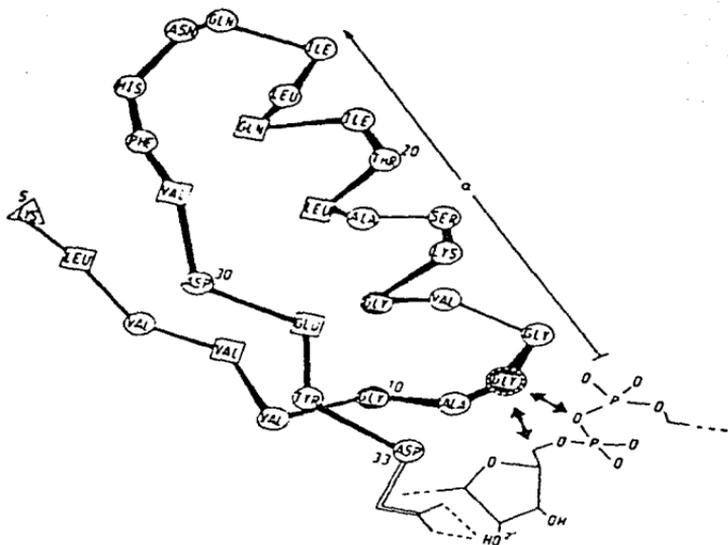


Fig.17. Estructura de la proteína p21. La primera y la tercera Gly del motivo que reconoce ATP forman una asa y la segunda Gly permite el acercamiento del pirofosfato. El Asp en posición 30, forma puentes de hidrógeno con el oxhidrilo unido al C2' del anillo de ribosa. Tomada de Wirenga *et al.* (1983).

diferentes aminoácidos se encuentran formando estructuras que ellos clasificaron como hélice α , hoja β y estructura al azar (random coil); se propone un algoritmo que permite predecir la estructura secundaria de diferentes proteínas. Así pues, asignando valores de frecuencia a cada aminoácido se e puede clasificar como formador fuerte, mediano o débil de determinada estructura secundaria. Al hacer el conteo de la frecuencia para cada aminoácido en una secuencia determinada, es posible predecir el tipo de estructura secundaria que formará dicha secuencia.

Después del trabajo de Chou y Fasman, se desarrollaron otros métodos de predicción (Garnier, Novotny, etc.) pero en esencia todos se basan en el análisis de la frecuencia con que los aminoácidos se encuentran formando las estructuras secundarias conocidas: hélices α , hojas y giros β , asas, etc.

En la actualidad, la aplicación de los diferentes algoritmos de predicción se puede realizar más rápida y sistemáticamente mediante el uso de programas de computadora, como Pc/Gene, en los que se hallan cargados dichos algoritmos. Es indispensable advertir que la confiabilidad de estos métodos de predicción no va más allá del 60%, por lo que se debe tomar con cierta reserva. De hecho se recomienda que en un trabajo de predicción siempre se consideren por lo menos unos cuatro métodos para lograr un análisis más completo y una predicción más certera.

HIPOTESIS

Sabiendo que la unión específica de la [³H]-ryanodina sirve como prueba del estado funcional de su receptor, es posible realizar ensayos que permitan caracterizar el efecto modulador de diversas purinas, de los nucleótidos de adenina y de la carga energética, sobre este canal liberador de calcio.

Considerando la estructura básica de los nucleótidos de adenina, se propone que el RyR también sea capaz de reconocer purinas de importancia fisiológica como la adenosina y los productos de su catabolismo. Además; las diferencias en la estructura molecular que presentan estos últimos entre sí, pueden proporcionar información sobre la manera en como interactúan las purinas en general con el RyR.

OBJETIVOS

Con base en los antecedentes presentados y la hipótesis anterior, se proponen los siguientes objetivos:

GENERALES

1. Caracterizar el efecto modulador de diferentes derivados purínicos sobre el Receptor de Ryanodina (RyR), mediante ensayos de unión específica con [³H]-ryanodina.
2. Realizar cálculos mecánico-cuánticos que definan parámetros que permitan relacionar la estructura de las moléculas moduladoras con su efecto sobre el RyR.
3. Predecir, con base en la secuencia aminoácida del RyR, los sitios de reconocimiento de purinas, así como la estructura secundaria de los sitios de unión propuestos para ATP.
4. Con base en la información generada en los incisos anteriores, proponer la forma de cómo interactúan las purinas moduladoras con el RyR.

PARTICULARES

1. Aislar el retículo sarcoplásmico pesado a partir del músculo esquelético rápido de conejo y caracterizar esta fracción rica en RyR mediante electroforésis en condiciones desnaturalizantes.
2. Caracterizar, mediante ensayos de unión específica con [³H]-ryanodina, el efecto modulador de la carga energética, de los nucleótidos de adenina (en condiciones fisiológicas) y de la ADO y sus catabolitos sobre el RyR.
3. Determinar el vector momento dipolar (μ) de las moléculas moduladoras, aplicando cálculos semiempíricos.
4. Predecir, con base en la secuencia aminoácida del RyR, la estructura secundaria de los sitios de reconocimiento propuestos para ATP, mediante los métodos de Chou-Fasman, de Garnier, de Novotny y Gascuel-Golmard (GGBSM) y tratar de definir los sitios de reconocimiento a purinas.

METODOLOGIA

REACTIVOS

Sigma: CaCl_2 , grado 1, 99%, PM=147; MOPS, sigma ultra, 99.5%, PM=209.3; PPO, PM=221.3; PMSF, PM=174.2; Sacarosa, sigma ultra, 99.5%, PM=342.3; Pepstatina A, 75%, PM=685.9; Aprotinina, 4 TIU/mg; Benzimida, 97%, PM=156.6; Leupeptina, 68%, PM=475.6; Adenina, 99%, PM=171.6; ATP sal de sodio, 99-100%, PM= 551.1; ADP sal de sodio, 95-99%, PM=427.2; AMP sal de sodio, 99%, PM=347.2; ADO, 99%, PM=267.2; INO, 97%, PM=268.2; HIPO, 99%, 136.1; XAN, 99%, PM=152.1; AU, 99%, PM=168.1; D(-)Ribosa, PM=150.1; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 99%, PM=265.9; Reactivo de Folin y Ciocalteu's, 2N; BSA, 98-99%; $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, grado 1, 99%, PM=249.7; Glicina, 99%, PM=75.07; SDS, 95%, PM=288.4; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\geq 98\%$, PM=228.2; Trizma Base, G.R., PM=121.1; 2-Mercaptoetanol, $\geq 98\%$, PM=78.13.

Baker: KCl, R.A., 99.9%, PM=74.55; Tartrato de Sodio y Potasio tetrahidratado, R.A., 99.3%, PM=282.23; HClO_4 , R.A., 69.79%, PM=100.465; Glicerol, R.A., 99.5%, PM=92.1; Etilenglicol, R.A., 99%, PM=62.07; Etanol absoluto, R.A., 99.9%, PM=46.06; KOH, R.A. 89.1%, PM=56.11; HCl, R.A. 38.4%, PM=36.465; K_3PO_4 , R.A. 99.9%, PM=174.18.

Calbiochem: AMP-S, 82.6%, PM=375.1; ADP β -S, 90.1%, PM=461; AMP-PCP, $\geq 85\%$, PM=528.9; Ryanodina, 98.5%, PM=493.5.

Dupont: [^3H]-Ryanodina disuelta en etanol, 1.46 mM, Act. Esp.=68.4 Ci/mmol ó 3.7 MBq/ml, 98.7%, PM=493.5.

Mallinckrodt: K_2CO_3 anhidro, R.A., 98-99% PM=138.21; Acido Acético glacial, 100%, PM=60.05; n-Butanol, R.A., 99.3%, PM=282.23.

Merck: Metanol, para cromatografía 99.7%, PM=32.04; Acrilamida, G.C., 99% PM=71.05.

Drogueria Cosmopolita S.A. de C.V.: Xileno, grado industrial; Tritón X-100, grado industrial.

Bio-Rad: Azul de Coomassie G-250, $\lambda\text{OD}= 595 \text{ nm}$, CI 42655, PM=854. Marcadores de peso molecular preteñidos "high range" (miosina: 201 kD, β -galactosidasa: 117 kD, fosforilasa: 92 kD, BSA: 82 kD, ovalbumina: 47 kD), Catalog. 161-0309, Control 77096.

METODOS

OBTENCION DEL MUSCULO ESQUELETICO RAPIDO

El tejido requerido para este estudio fué obtenido de la espalda baja y patas traseras de conejos adultos jóvenes, de la raza Nueva Zelanda albino (*Oryctolagus uniculus*), de aproximadamente 4 kg de peso.

Antes de sacrificar al animal se le inyectó, vía intraperitoneal, con Anestésal (25 mg/kg peso), producido por SmithKline Beecham. Una vez dormido, se aplicó un coe en la yugular del conejo y se dejó desangrar. Posteriormente, se eliminó la piel y se extrajo el tejido con ayuda de material quirúrgico. Finalmente, se envolvió el tejido con papel aluminio y se congeló en un ultrarefrigerador a -70 °C.

PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DEL RETICULO SARCOPLASMICO PESADO (RSP)

HOMOGENEIZADO

a) Colocar 150 g de tejido finamente cortado en 150 ml de buffer A (sacarosa 0.3 M, tris-malato 20 mM, pH=7 e inhibidores de proteasas: Fluoruro de Fenilmetilsulfonio (PMSF), 100 µM; benzamida, 100µM; pepstatina A, 1µM; leupeptina, 1µg/ml; aprotinina, 1µg/ml).

b) Licuar a alta velocidad dos veces durante 30 s. cada una.

c) Adicionar 400 ml de buffer A y licuar otros 30 s.

FRACCIONAMIENTO

d) Centrifugar el homogeneizado en un rotor GSA a 5500 rpm (3000g), durante 30 min., en una centrífuga Sorvall RC-5B.

e) Filtrar el sobrenadante a través de una gasa procurando exprimir bien.

f) Centrifugar la fracción líquida con un rotor GSA ,9800 rpm (10000g), durante 30 min.

- g) Filtrar el sobrenadante a través de una gasa.
- h) Adicionar KCl hasta alcanzar una 0.5 M (3.7 g/100ml).
- i) Centrifugar con rotor 45Ti, 41000 rpm (130000g) durante 45 min., en una ultracentrifuga Beckman L-60 Clase R
- j) Resuspender el sedimento en 400 ml de buffer (sacarosa 0.3 M, KCl 0.6 M, ácido 3-[N-morfolino]propan sulfónico (MOPS) 10 mM y pH 7.4 y homogeneizar (homogeneizador Caframa tipo RZRI).
- k) Centrifugar con rotor 45Ti, 41000 rpm (130000g), durante 30 min.
- l) Resuspender el sedimento en un buffer que contenga sacarosa 0.3 M, KCl 0.4 M, MOPS 10 mM, pH 7.4 y homogeneizar en 20-25 ml.

GRADIENTE

- m) Depositar la fracción separada en un gradiente discontinuo de sacarosa formado por soluciones al 20% (superficie), 25%, 30%, 35% y 40% (fondo inferior). Cada solución contiene, además, KCl 0.4 M, MOPS 10 mM y un pH 7.4.
- n) Centrifugar con un rotor SW 28, 27000 rpm (130000g), durante 14 h.
- o) Diluir la interface obtenida entre 35 y 40 % de sacarosa en 3-4 volúmenes de MOPS 10 mM pH 7.4.
- p) Centrifugar con un rotor 60Ti, 42800 rpm (130000g), 30 min.
- q) Resuspender el sedimento en una solución que contenga sacarosa al 10%, KCl 0.1 M, MOPS 10 mM y pH 7.4.
- r) Separar alícuotas de aproximadamente 30 μ l y congelar a -70 °C. Esta fracción se denomina retículo sarcoplásmico pesado (RSP)

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA EN LA FRACCION AISLADA

La determinación de la concentración de proteína en la fracción aislada de RSP, se realizó espectrofotométricamente y siguiendo la técnica de Lowry. (Lowry 1951). La lectura de la absorbancia se hizo a 660 nm y la curva estandar se contruyó con alícuotas (5, 10, 20, 50, 100, 300 µg/µl) de una solución stock de seroalbúmina de bovino (BSA) que tenía una concentración de 5 mg/ml.

CARACTERIZACION DEL RyR POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se elaboraron geles en placa de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS (Laemli, 1970). Los carriles se cargaron con 10-15 µl de las fracciones obtenidas del aislamiento: F1, obtenida después del paso d); F2 obtenida después del paso f); F3, obtenida después del paso k); F4, obtenida después del paso m) y FA, que es el RSP. De esta última se utilizaron aproximadamente 250 µg de proteína para correr el gel.

El gel empacador se preparó al 3% y el gel separador se preparó al 5%. La corriente se mantuvo constante a 8 mAmp. y el voltaje en 80 V, aunque este último se aumentaba a 120 V cuando el frente de corrida pasaba al gel separador.

ENSAYOS DE UNION ESPECIFICA CON [³H]-RYANODINA

Se siguió la técnica la reportada por Chu *et al.*, 1990. Brevemente: la [³H]-ryanodina (5.84 nM) fué incubada a temperatura ambiente y por triplicado con 10 µg de RSP durante 16-17 h. en KCl 300 µM, CaCl₂ 100 µM, MOPS 20mM (pH= 7.4), BSA 100 µg/ml, modulador (desde 0.1 nM hasta 10 mM) en un volumen final de 250 µl de volumen final. La unión inespecífica fué determinada incubando con ryanodina 1 µM (no radiactiva). Después de la incubación, los ensayos se filtraron en un multifiltro marca Brandel modelo M-48 y con papel filtro marca Whatman GF/F. Se hicieron cinco lavados de 5 ml con KCl 0.3 M. Para el conteo de la radiactividad en los papeles filtro (24 h después), se utilizaron 10 ml de tritosol (mezcla (1 L) de: 3 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) , 600ml xileno, 106 ml etanol, 37 ml etilglicol, 257 ml tritón X-100) por muestra.

DETERMINACIONES CON CON CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)

Para determinar la concentración de los nucleótidos de la adenina y de los catabolitos de la adenosina presente en el músculo esquelético y la cantidad de aquellos primeros que se hidroliza durante el ensayo de unión específica se aplicó una técnica que utiliza cromatografía líquida de alta presión.

1) Determinación de la cantidad de ATP hidrolizado durante el ensayo de unión específica

Por medio de la HPLC se midió la cantidad de ATP que se hidroliza cuando es adicionado al ensayo de unión con [^3H]-ryanodina. Para comparar más estrictamente, la determinación se realizó antes de la incubación y después de ella. Para detener la reacción en cada caso, se adicionaron 0.2 ml de HClO_4 al 8% y luego se neutralizó con 1.5 ml de K_2CO_3 5 M. Al hacer la diferencia de ambas determinaciones, es posible avariguar la cantidad de ATP hidrolizado durante el ensayo de unión específica. Es importante señalar que la cantidad de nucleótidos de adenina endógenos en la fracción aislada de RSP también fue determinada.

2) Determinación de la cantidad de AMP y ADP hidrolizado durante el ensayo de unión específica

Se prepararon seis ensayos de unión específica (de 500 μl como volumen final), con las siguientes características:

- a) AMP (5 mM) sin incubar.
- b) ADP (5 mM) sin incubar.
- c) AMP (5 mM) con incubación, pero sin RyR.
- d) ADP (5 mM) con incubación, pero sin RyR.
- e) AMP (5 mM) con incubación y con RyR.
- f) ADP (5 mM) con incubación y con RyR.

De cada muestra se utilizó un volumen total de 0.5ml y en cada alcuota la incubación fue detenida con 1.5 ml de HClO_4 al 8% y neutralizada con 0.2 ml de K_2CO_3 5 M.

3) Determinación de la concentración de AMP, ADP y ATP del músculo esquelético rápido de conejo y rata

Se extrajeron 2 g de tejido y se homogenizaron en 6 ml de HClO_4 0.4 M. Luego se centrifugó en un rotor Sorvall tipo SM-24 y en una centrifuga Sorvall RC-5B a 10000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se neutralizó con K_2CO_3 5 M y se diluyó 1:2 veces y se inyectaron 30 μl al cromatógrafo.

4) Determinación de la concentración de los catabolitos de adenosina en músculo esquelético rápido de conejo

Al igual que en el inciso anterior, se extrajeron 2 g de tejido y se homogenaron en 6 ml de HClO_4 0.4 M. Luego se centrifugó a 10 rpm durante 10 min. El sobrenadante se neutralizó con K_2CO_3 5 M, pero ahora se diluyó 1:5 veces y se inyectaron 15 μl al cromatógrafo.

Para realizar las determinaciones de los nucleótidos de la adenina se empleó un buffer de K_2HPO_4 0.09 M, hidróxido de butilamonio 0.5625 mM, MeOH 10% y pH 6.8 como fase móvil. En la determinación de la ADO, se utilizó un buffer de heptano-sulfonato 5 mM, pH 3.5 y en la determinación de la INO, la HIPO, la XAN y el AU, se empleó un buffer de acetato de amonio 0.025 M y 3% de MeOH.

En cada una de las determinaciones mencionadas, los estándares empleados (AMP, ADP, ATP, ADO, INO, HIPO, XAN, AU) fueron diluidos 1:1000 (10 mM a 10 μM) y tan sólo se inyectaron 50 μl (50 pmol) al cromatógrafo (marca LDC-Miltonroy, ConstaMetric; modelo III) a un flujo de 1 ml/min, una sensibilidad de 0.02 y una $\lambda = 250$ nm. La columna empleada fué una C-18, marca Waters, $\mu\text{Bondapack}$; modelo 27324 de 3.9 x 300 mm.

CALCULO DEL VECTOR MOMENTO DIPOLAR (μ)

Utilizando métodos semiempíricos de cálculo, se determinó la magnitud y la dirección del vector μ en las estructuras moleculares aisladas de la ADO y sus catabolitos. El primer paso en la estrategia del cálculo, fué dibujar la molécula mediante el programa PCMODEL (Serena Software Box 3076 Bloomington, In 47402-3076), aplicable en una computadora personal, con el cual, además, fué posible obtener una estimación (sólo la magnitud del vector), pero considerando solamente argumentos de la física clásica. No obstante, la información de salida de PCMODEL sirve como base de entrada para el programa MOPAC (versión 6.0 de Serena Software Box 3076 Bloomington, In 47402-3076), también

aplicable en una PC, mismo que, al emplear argumentos mecánico-cuánticos, permitió el cálculo más preciso del vector μ . Para lograr minimizar el energía de cada molécula; es decir para converger el cálculo, se realizaron hasta dos cálculos utilizando el primero de ellos como base de partida para el siguiente. El operador Hamiltoniano seleccionado (aquel que al aplicarlo a la función de onda de la molécula en estudio, permite obtener la misma función multiplicada por el valor de la energía) para el cálculo fué el MNDO, aunque otros hamiltonianos como el PM3 ó el AM1 no mostraron diferencias significativas en los valores obtenidos (datos no mostrados) para el vector μ .

Debido a que en MOPAC sólo se generan valores numéricos, se tuvo que trasladar -utilizando el formato adecuado- la información de PcmODEL a otro programa llamado SYBYL (aplicable en una computadora Silicon Grphics) con el que se tendría, además del cálculo del vector μ , una representación gráfica tanto de las moléculas como del vector en cuestión; de tal manera, que resultaría menos complicado interpretar los resultados incluyendo la orientación del vector μ en cada estructura molecular.

El cálculo del vector μ obtenido en MOPAC considera dos contribuciones: una debida a la carga y otra debida a la hibridación de cada átomo en la molécula. En SYBYL ésto no ocurre, y solamente se consideran las cargas de los átomos. Por ello fué necesario incluir en el sistema de cada molécula un átomo ficticio (o Dumie en inglés) al que se le asignó una carga de 0.1041 coulombs. Para no alterar dicho sistema, también se introdujo en el origen (C4 del anillo purínico) una carga de -0.1041 coulombs. Recuerdese que el vector μ en cada una de las tres coordenadas x, y, z es igual al producto de la coordenada por la magnitud del momento dipolar en esa dirección. Esta estrategia permitió incluir la contribución debida a la hibridación de cada átomo en el cálculo del vector μ con SYBYL y, consecuentemente, se logró hecer coincidir los valores obtenidos con MOPAC, los cuales siempre se consideraron como los válidos e importantes.

Ahora bien, es necesario aclarar tres cosas: 1) que la estrategia matemática empleada no alteró, en lo absoluto, la estructura de las moléculas bajo análisis, ya que solamente permitió, como ya se dijo, incluir la contribución al vector μ por efecto de la polarización que ejerce cada átomo debida a su hibridación y 2) que la minimización lograda en cada cálculo, debe considerarse como parcial, ya que las moléculas no fueron relajadas del todo. Cuando ésto se hizo, el cálculo se complicó a tal grado que, en casos como el de la ADO o el de la INC, no se logró la convergencia. 3) Los cálculos se realizaron de acuerdo a las formas tautoméricas (ceto o enol) que predominan a pH 7 (Mahler y Cordes 1966).

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

Se localizaron los cinco sitios (699-706, 1195-1200, 2370-2375, 4449-4454, 4602-4607), propuestos para el reconocimiento de ATP en la secuencia del RyR y se introdujeron las secuencias de aminoácidos, utilizando el código de una letra, al banco de datos del programa empleado para la predicción (Pc/Gene versión 6.60/Julio 1991, No. serie: IGI2300, ™IntelliGenetics Inc.). Cada una de las secuencias comprendió al motivo de ATP (GXGXXG), y cincuenta aminoácidos antes y cincuenta aminoácidos después de dicho concenso. Los cuatro métodos de predicción fueron: el de Chou-Fasman (versión 1.05/Sept. 1990), el de Garnier, Osguthorpe y Robson (versión 3.10/Sept. 1990), el de Gascuel y Golmard ó GGBSM (versión 1.01/Sept. 1990) y el de Novotny y Auffray (versión 1.10/Sept. 1990).

Para identificar cada secuencia con su respectivo concenso se asignaron nombres específicos:

TABLA II

Nombre de la Secuencia	Ubicación del Motivo de Glicinas
Rya 1	699-706
Rya 2	1195-1200
Rya 3	2370-2375
Rya 4	4449-4454
Rya 5	4602-4607
p21	10-15

Para el caso de la proteína p21, como el motivo de glicinas se ubica en las posiciones 10-15, sólo se introdujeron 36 aminoácidos. De hecho para el análisis de la predicción sólo se consideraron nueve aminoácidos antes y 20 aminoácidos después del concenso en cada secuencia del RyR.

La estructura tridimensional, a 2.4 °A de resolución de la proteína p21, fué obtenida de un banco de proteínas de la Universidad de California Los Angeles (UCLA), EUA, con dirección y claves:
<http://www.biochem.ucla....pdbsum/621p/pdbhead.txt>

En principio, la estructura que se obtuvo del banco de proteínas de UCLA era una mutante de humano en donde una Gln en la posición 61 se sustituyó por una His. Por ello, para obtener la secuencia de p21, sólo bastaría cambiar la His por la Gln. Sin embargo, esto no fué necesario, ya que para el estudio de predicción sólo se introdujeron, como ya se dijo, los primeros 36 aminoácidos de p21.

RESULTADOS

CARACTERIZACION DEL RyR POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Al observar el gel de poliacrilamida (Fig.18a), se tiene que en las fracciones que se han eliminado los núcleos (F1) y las mitocondrias (F2) aún no se aprecia el RyR. Sin embargo, en la fracción con los microsomas (F3 y F4) la banda del RyR se define bien hasta terminar el aislamiento (FA). Si se compara este gel con el reportado en la literatura (Hawkes *et al.* 1989) (Fig.18b), se puede apreciar que en ambos el RyR se observa como una banda de alto peso molecular ubicada en la parte superior de las columnas. También se observan la ATPasa, la casecustrina y una proteína aún no caracterizada de 200kD.

DETERMINACIONES CON CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)

1) Determinación de la cantidad de ATP hidrolizado durante el ensayo de unión específica

TABLA III

ENDOGENO	AMP (pmol) N.D.	ADP (pmol) 6	ATP (pmol) 8	TOTAL 14
ANTES INCUBACION	N.D.	113	593	706
DESPUES INCUBACION	174	399	46	619

Los resultados de esta determinación muestran que al inicio de la incubación, un 16% del ATP se encuentra ya hidrolizado y que después de la incubación, sólo un 6.5% del ATP queda sin hidroliza. No obstante, la diferencia antes y después de la incubación es mínima, lo que hace pensar que las membranas intercambian al ATP en los otros dos nucleótidos.

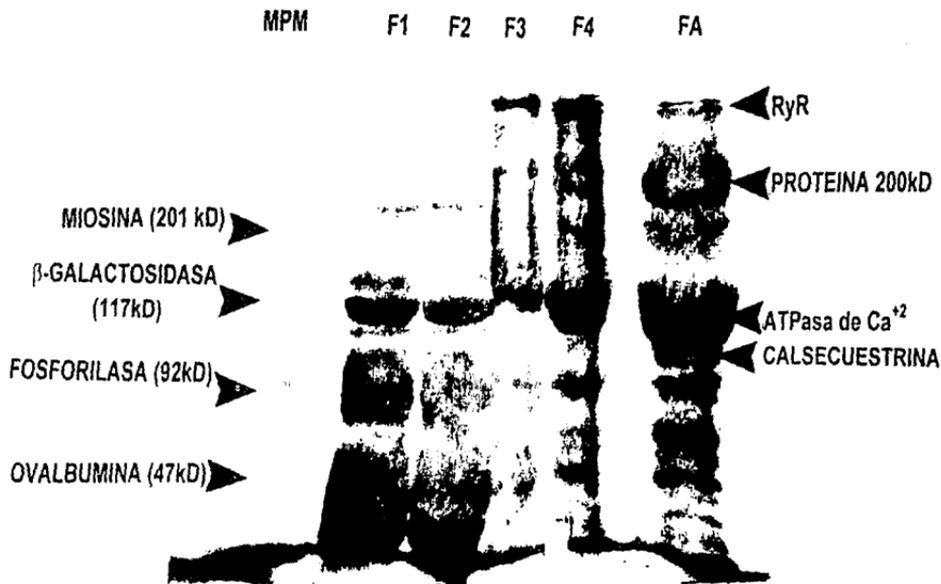


Fig.18a. Fotografía del gel de electroforesis donde el RyR aparece como una proteína de alto peso molecular en la parte superior de las columnas. También se observan la ATPasa, la calsequestrina y una proteína aún no caracterizada de 200kD. MPM= Marcador de peso molecular; BSA= Seroalbumina de bovino F1 (Frac. sin núcleos), F2 (Frac. sin mitocondrias), F3 (Frac. con microsomas sin proteínas precipitadas con KCl), F4(Frac. con microsomas y proteínas precipitadas con KCl),FA= Fracción Aislada de retículo sarcoplásmico pesado (RSP).

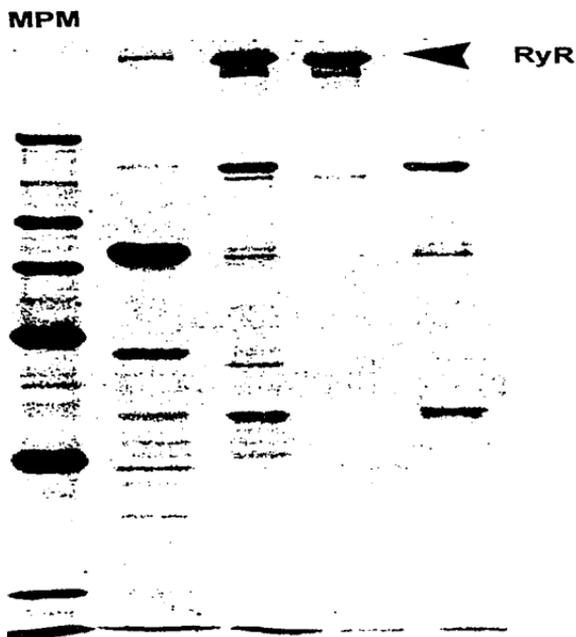


Fig.18b. Fotografía del gel reportado en la literatura (Hawkes *et al.* 1989) para caracterizar al RyR. Las condiciones también se ajustan a la técnica de Laemmli (1970). Los MPM fueron de: 200 kD, 116 kD, 97.4 kD, 66.2 kD y 42.7 kD.

2) Determinación de la cantidad de AMP y ADP hidrolizado durante el ensayo de unión específica con [³H]-ryanodina

TABLA IV

MUESTRA (5 mM)	NUCLEOTIDO	nmol
AMP incub.	AMP	858.9164
	ADP*	42.9495
	ATP	—
ADP sin incub.	AMP	137.8709
	ADP	1152.5226
	ATP*	117.3588
AMP incub. sin proteína	AMP	997.0324
	ADP*	84.4761
	ATP	—
ADP incub. sin proteína	AMP	135.5839
	ADP	1048.1242
	ATP*	84.7176
AMP incub. con proteína	AMP	563.1636
	ADP*	102.0698
	ATP	—
ADP incub. con proteína	AMP	164.7427
	ADP	1160.6727
	ATP	—

*** Contaminación del reactivo desde su elaboración**

En los resultados de la Tabla anterior, se observa que la incubación sólo provoca la hidrólisis del ADP, pero en forma muy discreta de apenas un ≈10%. Contradictoriamente, la presencia de la fracción aislada de RSP, aparentemente, provoca la hidrólisis del AMP en un ≈26 %, mientras que el ADP no se ve afectado. Nuevamente, estos resultados sugieren que, en el ensayo de unión específica, los nucleótidos son transformados por las membranas.

Es necesario precisar que el objetivo de estos resultados y los observados en la determinación de ATP hidrolizado, es el de determinar si los nucleótidos de adenina son hidrolizados al ser incubados y no el de cuantificar la concentración de éstos en el músculo esquelético. Esto se debe a que, en

virtud de la incertidumbre que generan los resultados obtenidos, no es posible atribuir la respuesta que presenta el RyR al interaccionar con dichos nucleótidos, sino a los diferentes productos de hidrólisis. Por ello, para realizar los ensayos de unión específica con [³H]-ryanodina se decidió utilizar productos análogos a los nucleótidos, pero con la cualidad de no ser hidrolizables. Los análogos seleccionados, debido a la similitud de su comportamiento bioquímico con respecto a los nucleótidos de adenina naturales, son: el adenosin-5'-otiomonofosfato de dilutro ó AMP-S (análogo del AMP), el adenosin-5'- α -(2-tiodifosfato) de trilitio ó ADP β -S (análogo del ADP) y el adenilil-(β , γ -metileno)-difosfonato de tetralitio ó AMP-PCP (análogo del ATP). El uso de estos análogos no hidrolizables ya ha sido reportado en trabajos anteriores (Meissner, 1986; Fleischer e Inui, 1989; Hamilton *et al.*, 1989; Chu *et al.*, 1990; Hawkes *et al.*, 1992; Fuentes *et al.*, 1994; etc.).

3) Determinación de la concentración de AMP, ADP y ATP en músculo esquelético rápido de conejo y rata

a) En rata (experimento control)

TABLA V

NUCLEOTIDO	nmol	CONCENTRACION EN EL TEJIDO (mM)
AMP	377.3	0.3773
ADP	1530.6	1.5306
ATP	8877.3	8.8773

CE= 0.93

b) En conejo (Fig.19)

TABLA VI

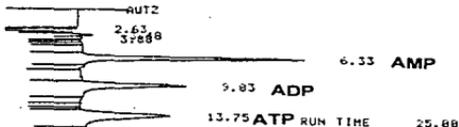
NUCLEOTIDO	nmol	CONCENTRACION EN EL TEJIDO (mM)
AMP	102.9	0.1029
ADP	1320.6	1.3206
ATP	9513.1	9.5131

CE= 0.89

PLOT

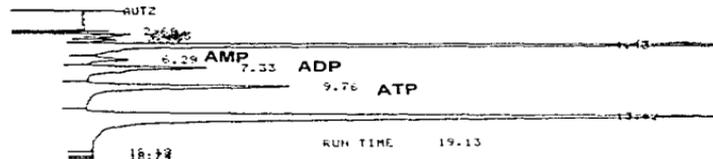
NOISE 29

IEEE NO 31 SAMPLE 0006 METHOD METHOD1 TIME 12:53:40 DATE 07:04:95



DEFAULT 0	NORMALIZATION	METHOD USING	AREA	%AREA
TIME	HEIGHT			
2.63	1098		2994	2.8964421
2.85	257		3308	6.7562997
3.48	292		5484	11.8942028
3.88	81		2140	0.6225293
8.73	2922		129984	37.6718178
9.03	1360		51085	46.3908025
13.75	1130		103049	29.8654668
TOTAL			347044	100.0000000

IEEE NO 31 SAMPLE 0011 METHOD METHOD1 TIME 15:24:43 DATE 07:04:95



DEFAULT 0	NORMALIZATION	METHOD USING	AREA	%AREA
TIME	HEIGHT			
2.69	1264		14825	0.4875032
3.64	1725		34186	6.9368541
3.23	1560		47085	11.3131378
3.48	1440		41054	11.496892
3.62	1510		74588	21.8488608
4.43	15102		100425	42.1330248
7.33	464		20652	4.2516332
7.33	1049		21366	5.5897911
9.76	2046		110450	41.2562350
10.62	9130		147049	40.7923738
TOTAL			344042	100.0000000

Fig.19. Cromatograma de la determinación de la concentración de nucleótidos de adenina en músculo esquelético rápido de conejo. De la determinación se obtiene que la [ATP]= 9.513 mM, la [ADP]=1.321 mM, la [AMP]=0.103 mM y la CE= 0.93. En la parte superior se muestra el cromatograma de las soluciones estándar (50 µl de una solución 0.01 mM) empleadas en la determinación.

4) Determinación de la concentración de catabolitos de adenosina en músculo esquelético rápido de conejo (Fig.20a, 20b)

TABLA VII

CATABOLITO	$\mu\text{mol/g tej.}$	CONCENTRACION EN EL TEJIDO (mM)
ADO	0.0624	0.0624
INO	4.92	4.92
AU	2.273	2.273

La determinación de la concentración de AMP, ADP y ATP presenta valores altos. No obstante, la C.E. corresponde bien -tanto en la rata como en el conejo- con la usualmente reportada de alrededor de 0.9 (Atkinson,1977). Sin embargo, en la rata las proporciones entre AMP, ADP y ATP son de 1:4.05:23.5 respectivamente, mientras que en el conejo son de 1:12.8:92.4 respectivamente.

Por otro lado, al determinar la concentración de los diferentes catabolitos de la ADO en el músculo esquelético, se observa que solamente se encuentran presentes la ADO, la INO y el AU a concentraciones altas.

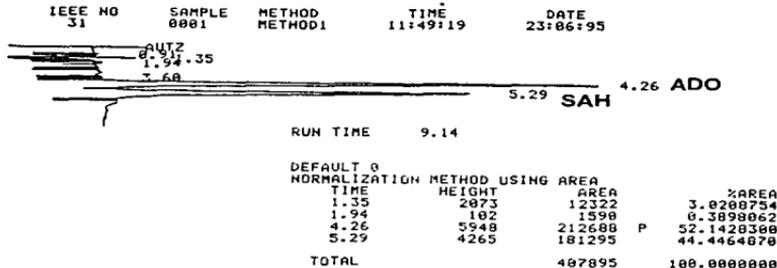
ENSAYOS DE UNION ESPECIFICA CON [^3H]-RYANODINA

A continuación se presentan las curvas de dosis respuesta (Figs.21-34) obtenidas en los ensayos de unión específica. Estas curvas están normalizadas con respecto al experimento control. En la mayoría de ellas, el eje de las abscisas corresponde al Log [modulador] (μM) y en el de las ordenadas el % de unión específica (ó % de binding) de [^3H]-ryanodina:

MODULACION POR CARGA ENERGETICA (CE)

Al estudiar la modulación de los nucleótidos de adenina, a las concentraciones del estado basal (Tabla VIII, Fig.21), sobre el RyR; se observa que el AMP activa al RyR 1.5 ± 0.12 veces sobre el control, mientras que el ADP no observa efecto alguno. De los tres nucleótidos empleados en este estudio, el ATP es el que presenta la activación mayor de 2.1 ± 0.18 veces sobre el control.

PLOT
 NOISE 184
 PLOT
 NOISE 93
 PLOT
 NOISE 74



PLOT
 NOISE 147

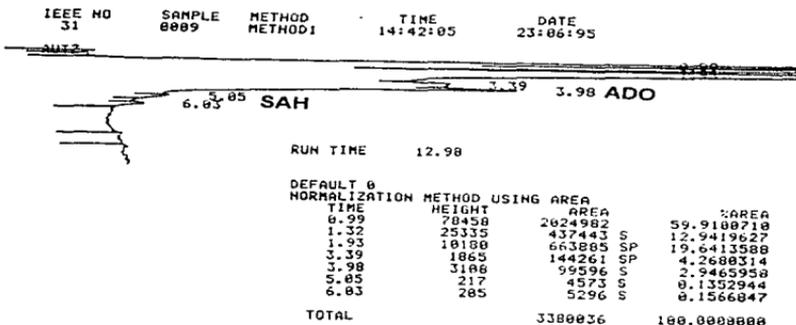


Fig.20a. Cromatograma de la determinación de la concentración de la ADO (0.062 mM) en músculo esquelético rápido de conejo. El cromatograma de arriba corresponde a las soluciones estándar (50 µl de una solución 0.01 mM). Aunque se encontró S-Adenosinhomocisteína (SAH) a una concentración de 3.4 nM, no se consideró para probarse en este estudio. Recuerdese que la determinación de ADO se realiza en un buffer de corrida diferente al que se usa con sus catabolitos (vease la Metodología).

NOISE 29

IEEE NO	SAMPLE	METHOD	TIME	DATE
31	8885	METHOD1	12:56:14	28:09:15



RUN TIME 9.04

TIME	HEIGHT	AREA	%AREA
2.73	99	2818	0.7005845
3.72	1329	44632	11.1033218
4.18	3487	203919	50.7231238
5.13	1868	150646	37.4735708
TOTAL		402086	100.0000000



RUN TIME 13.69

TIME	HEIGHT	AREA	%AREA
3.20	527	19612	1.5278105
3.77	2026	152338	11.8589945
5.05	3629	1111825	86.6131940
TOTAL		1283667	100.0000000

Fig.20b. Cromatograma de la determinación de la concentración de los catabolitos de ADO en músculo esquelético rápido de conejo, de los cuales sólo se encontraron presentes la INO (4.92 mM) y el AU (2.27 mM). El cromatograma de arriba corresponde a las soluciones estándar (50 µl de una solución 0.01 mM). Recuerdese que la determinación se realiza en un buffer de corrida diferente al que se usa con la ADO (vease la Metodología).

Al mezclar el ADP con el AMP, se muestra que el efecto de este último se potencia y la acción del ATP se repite. Al mezclar el AMP y el ATP ó el ADP y el ATP, nuevamente se aprecia la potenciación del AMP o del ADP sobre la activación del ATP (3.98 ± 0.39 y 3.42 ± 0.11 , respectivamente). Cuando se mezclan los tres nucleótidos en la proporción que permite una CE de 0.93 (basal) se ve una activación (2.67 ± 0.45), pero la potenciación es menor que en los últimos dos casos.

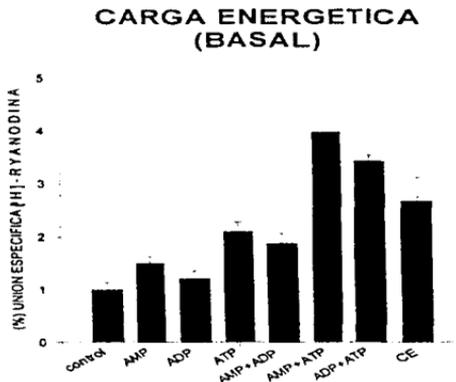


Fig.21. Modulación del RyR por nucleótidos de adenina y CE en el nivel basal. La modulación fue seguida mediante ensayos de unión específica con [³H]-ryanodina (Chu et al., 1990) en retículo sarcoplásmico pesado. Cada barra está normalizada con respecto al control.

Por otro lado, aunque se diluya diez veces la concentración de los tres nucleótidos, mientras se mantenga el mismo valor de CE, es decir, mientras se conserve la misma proporción entre ellos; el efecto modulador presenta el mismo esquema (Fig.22).

CARGA ENERGETICA (BASAL Y BASAL/10)

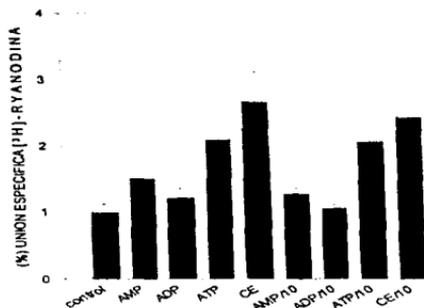


Fig.22. Modulación del RyR por CE en el nivel basal y a concentraciones de AMP, ADP y ATP diez veces diluida. En ambos casos el valor de CE se mantiene en 0.93. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

Si ahora se modifica el valor de la CE de acuerdo con los valores de la Tabla siguiente:

TABLA VIII

CONDICION METABOLIC	[AMP] (mM)	[ADP] (mM)	[ATP] (mM)	C.E.
A				
Basal	0.103	1.321	9.513	0.93
Ejercicio Exah.	0.600	2.200	8.100	0.84
Perfus. ADO	0.054	1.170	12.350	0.95
Perfus.	2.190	7.210	5.570	0.61
Fructosa				

se observa (Fig.23) que sólo cuando la CE disminuye drásticamente se observa un abatimiento significativo de la activación del RyR. Utilizando ambos efectos para decifrar cual de los tres nucleótidos contribuye de manera más importante en la modulación del RyR por la CE (Fig.24) se aprecia que el ATP, a la concentración que genera ese valor de CE, es capaz de reproducir cada activación por sí sólo.

CARGA ENERGÉTICA

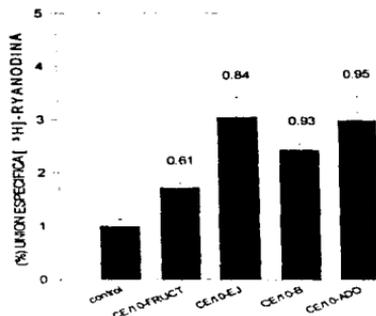


Fig.23. Modulación del RyR por variaciones reales (perfusión de hígado con D-fructosa durante 1h, ejercicio exhaustivo, nivel basal e inyección de ADO) de la CE. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

Es importante aclarar que en los ensayos realizados para analizar el efecto de la CE sobre la modulación del RyR, se llevaron a cabo conservando los valores de CE señalados en la tabla anterior, pero diluyendo diez veces la concentración de cada nucleótido en la mezcla.

CE Y ATP

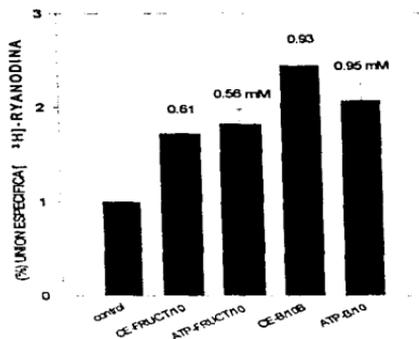


Fig.24. Comparación de los efectos producidos por variaciones drásticas de la CE y por el ATP (individualmente) a la concentración que genera el valor de CE que se señala a su izquierda. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

Al comparar los efectos de los tres nucleótidos, por separado, cuando se encuentran a la misma concentración (≈ 1 mM) en el ensayo, se ve que el ATP es el mejor activador de los tres (Fig.25)

NUCLEOTIDOS DE ADENINA

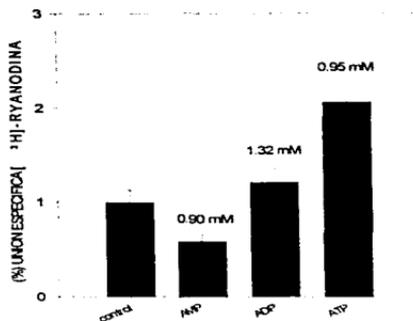


Fig.25. Modulación del RyR por nucleótidos de adenina a la misma concentración de ≈ 1 mM). Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

Resulta interesante comentar que si se mezclan en el mismo ensayo la adenina, la ribosa y el fosfato de potasio, a la misma concentración de 0.1209 mM que es la que tiene el AMP en el nivel basal; no presentan efecto modulador alguno (Fig.26).

AMP

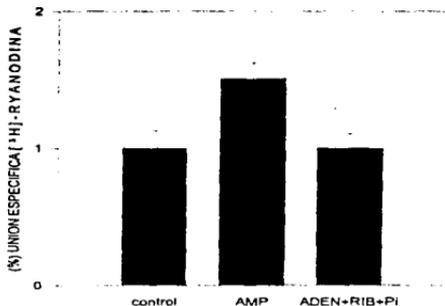


Fig.26. Comparación de la modulación del AMP y de la mezcla en solución de adenina, ribosa y K_3PO_4 . Ambos casos a la misma concentración de 0.1209 mM (nivel basal). Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

MODULACION POR ADO Y SUS CATABOLITOS

El efecto de la ADO sobre la unión específica de la [3H]-ryanodina presenta un patrón de modulación complejo (Fig.27); primero se observa una activación en el intervalo nanomolar (nM) de 4.36 ± 0.14 veces sobre el control, la cual disminuye sostenidamente al aumentar la concentración hasta aproximadamente la mitad. Ahora bien, ni la adenina ni la ribosa presentan modulación alguna sobre el RyR, ya sea por separado o mezclados en solución (Fig.28).

ADENOSINA

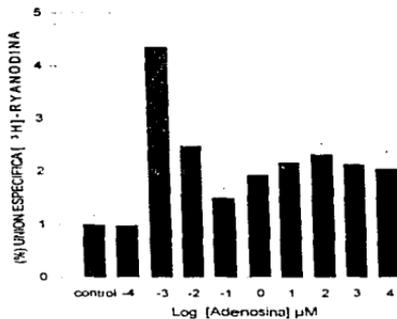


Fig.27. Curva dosis-respuesta de la ADO. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

ADO, AD Y RIB (1 nM)

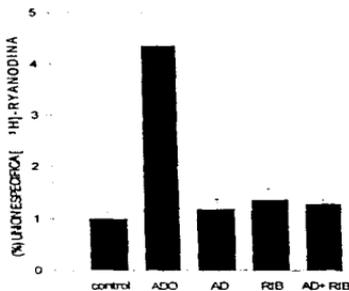


Fig.28. Modulación de la adenina y de la ribosa a la concentración donde se observó la mejor activación del RyR por la ADO. Nótese que ni aún mezclándolas a esas concentraciones muestran activación del receptor. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

Para la INO, también se tiene una activación en el intervalo nM, pero de sólo 2.54 ± 0.25 veces sobre el control, la cual disminuye al incrementar la concentración y luego se recupera en $10 \mu\text{M}$, para, posteriormente, volver a decaer (Fig.29).

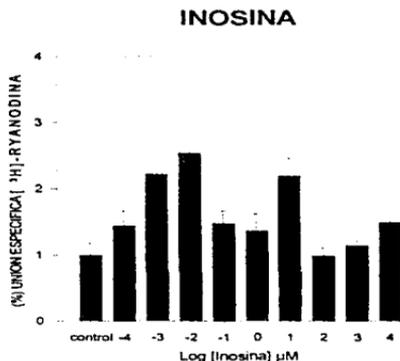


Fig.29. Curva dosis-respuesta de la INO. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

Con la HIPO, sólo se observa una activación discreta (1.42 ± 0.15 veces sobre el control) en la región nM y parte de la μM , misma que se repite (1.7 ± 0.18) en $10 \mu\text{M}$ (Fig.30).

HIPOXANTINA

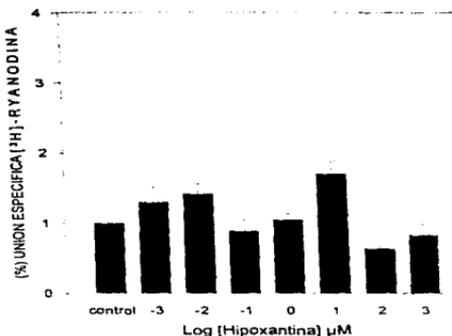


Fig.30. Curva dosis-respuesta de la HIPO. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

La XAN es la que presenta la mayor activación (6.03 ± 1.21 veces sobre el control) en $0.01 \mu\text{M}$, la cual se desvanece al incrementar la concentración del catabolito (Fig.31). El mismo patrón de respuesta se observa con el AU, pero la activación del RyR en $0.01 \mu\text{M}$ es menor (2.07 ± 0.41 veces sobre el control) con respecto a la mostrada por la XAN (Fig.32).

XANTINA

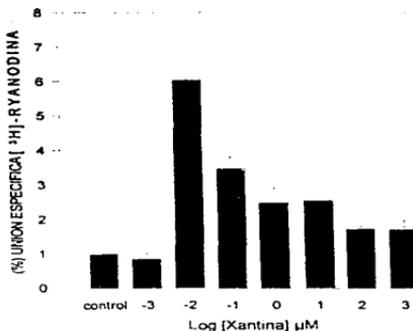


Fig.31. Curva dosis-respuesta de la XAN. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

ACIDO URICO

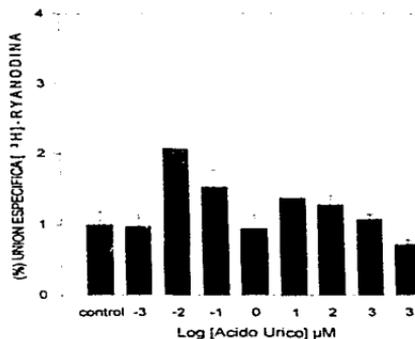


Fig.32. Curva dosis-respuesta del AU. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

De acuerdo con las determinaciones hechas mediante HPLC, los únicos catabolitos detectados fueron la ADO (0.0624 mM), la INO (4.92 mM) y el AU (2.27 mM). Cuando los tres están presentes a las concentraciones fisiológicas encontradas (Fig.33), se ve que el efecto activador mostrado por la ADO, para ese intervalo de concentración (10-100 μ M), es abatido tanto por la INO como por el AU. Esto sugiere que ambos catabolitos son reconocidos por el RyR en el mismo sitio que la ADO. Esta generalización podría extenderse también a la HIPO y a la XAN dada la similitud en su estructura básica con los ejemplos analizados.

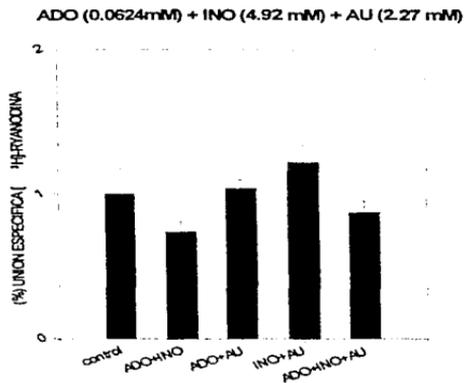


Fig.33. Modulación del RyR por la ADO y sus catabolitos encontrados en el músculo esquelético. Cada catabolito está mezclado a la concentración a la que se le encontró en ese tejido. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.21.

Por otra parte, si se mezclan la ADO y el ATP (Fig.34) en concentraciones (1 nM y 3 mM respectivamente) que muestran una máxima activación se observa que el ATP atenúa el efecto de la ADO.

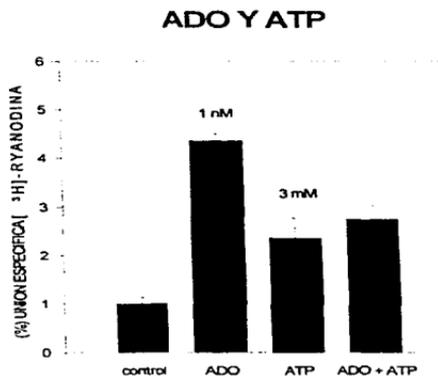


Fig.34. Comparación de los efectos de la ADO y el ATP a una concentración (0.1 μ M y 3 mM, respectivamente) de máxima activación del RYR. Los efectos se aprecian por separado y cuando se les mezcla a esas mismas concentraciones.

CALCULO DEL VECTOR MOMENTO DIPOLAR (μ)

Ya se estableció que la ADO y sus catabolitos presentan diferencias estructurales entre sí, las cuales pueden influir en la manera en como son reconocidas por el RyR. Si se considera que todas las moléculas interaccionan o se enlazan entre sí por medio de sus electrones, entonces al determinar la orientación de la densidad electrónica mediante el calculo del vector μ , se podrá conocer como estas purinas se orientan para interaccionar con el RyR.

A continuación se presentan las coordenadas y la magnitud del vector μ para la adenina, la ribosa, la ADO y sus catabolitos. El origen del sistema coordenado se fijó en el C4 del anillo purínico, el cual describe el eje "X" junto con el N9 del mismo anillo. El C5, está ubicado en el plano "XY", y el eje "Z" está perpendicular al plano del papel. En la β -ribofuranosa, el origen se ubicó en el C1', el cual forma el eje de las abscisas con el C2'. El hidrógeno unido en posición α a este último átomo, se ubica en el plano "XY".

Las estructuras fueron calculadas de acuerdo a la forma tautomérica (ceto o enol) que predomina a pH 7.

TABLA IX

CATABOLITO	x	y	z	MAGNITUD
Adenina	2.162	0.126	1.136	2.445
β -ribofuranosa	0.782	-0.333	-0.044	0.851
ADO (anti)	2.529	-0.150	1.141	2.778
ADO (syn)	2.276	0.649	1.675	2.899
INO (anti)	1.129	-4.610	-0.020	4.747
INO (syn)	1.146	-3.875	0.706	4.103
HIPO	0.850	-4.458	0.000	4.539
XAN	5.056	-4.039	0.000	6.472
AU	2.595	1.683	-0.007	3.093

Antes de abordar, con más detalle, los resultados de la Tabla anterior, es importante explicar que en el caso de la ADO y de la INO, el enlace covalente entre los dos sistemas anulares, el de purina y el de ribosa, da lugar a una libre rotación entre ellos, con lo cual se generan dos conformeros: el anti y el syn. Estudios por resonancia magnética nuclear (RMN), señalan que, aparentemente, los conformeros syn constituyen la mayoría de las especies en solución. No obstante, esto no implica que ese conformero sea el reconocido por el RyR (Olsson 1983).

Para el caso de la ADO (Figs.35a, 35b), se aprecia que no hay diferencias significativas entre ambos conforméromos, de tal suerte que mientras la ADO anti presenta al vector μ (flecha verde) orientado hacia la región entre el C4 y el N3 del anillo de adenina; la ADO syn sólo observa un desplazamiento del vector hacia la región inferior ubicada entre el C2 y el N3.

Analizando la situación para la adenina y la β -ribofuranosa solas (Figs.36, 37), se observa que la adenina presenta una orientación del vector μ similar al de la ADO (ambos conforméromos), pero con un desplazamiento hacia el N1; mientras que en la β -ribofuranosa, el vector observa una dirección casi perpendicular con respecto a los dos ejemplos anteriores y una magnitud menor, es decir que la adenina contribuye más a la magnitud y a la dirección del vector μ en la ADO que la β -ribofuranosa.

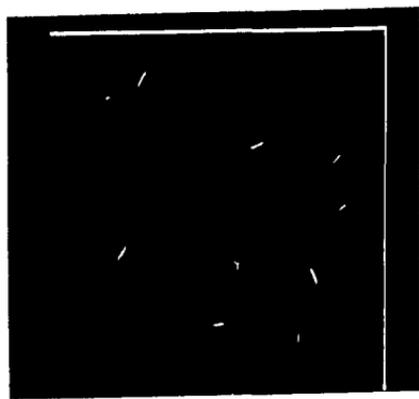
Para la INO (Figs.38a, 38b), se presenta una situación similar a la vista con la ADO; es decir, que ambos conforméromos muestran una orientación y una magnitud parecida, pero en el conforméromo anti el vector μ se orienta más hacia la región entre N7 y el C8 del anillo purínico, mientras que en el syn, se orienta hacia el espacio entre N7 y el C5.

Si se compara los vectores μ de la ADO y de la INO (ambos conforméromos), se aprecia que la eliminación del grupo amino unido al C6 y la oxidación en ese mismo sitio, cambia la distribución electrónica y los vectores μ de ambos derivados son casi perpendiculares si.

Cuando la INO pierde el anillo de ribosa se obtiene la HIPO (Fig.39). En esta purina se aprecia un aumento, al doble, en la magnitud del vector μ ; sin embargo, no ocurre ninguna modificación significativa respecto a su dirección.

Si ahora se oxida el C2 del anillo purínico como en la XAN (Fig.40), se observa, por un lado, un cambio en la orientación del vector μ hacia el espacio entre el N1 y el C6 del anillo purínico; y por otro, un aumento de la polaridad de la molécula manifestada en un aumento en la magnitud del vector μ .

Finalmente, si la XAN experimenta otra oxidación en el C8 de anillo de purina, se obtiene el AU (Fig.41). En esta molécula se aprecia un aumento de la simetría y, consecuentemente, un disminución en la magnitud del vector μ , el cual se reorienta, pero ahora hacia el C2.



(a)



(b)

Fig.35. Estructura de la ADO. a) confórmero anti y b) confórmero syn. La flecha en verde representa al vector μ calculado por métodos semiempíricos utilizando el programa MOPAC con un operador hamiltoniano de tipo MNDO. La imagen que se aprecia se logró con ayuda del programa SYBYL (ver Metodología). C= gris, N= azul oscuro, O= rojo, H= azul claro, Vector μ = flecha verde.

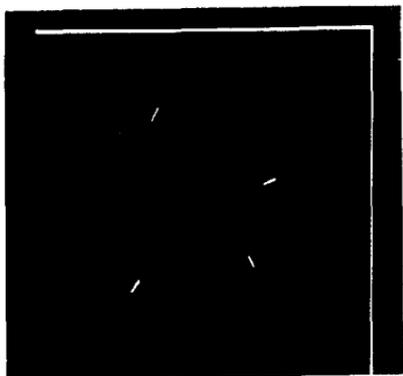
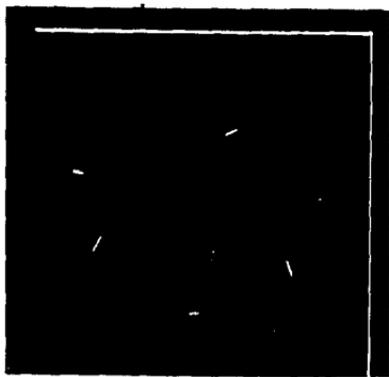


Fig.36. Estructura de la adenina y su vector μ . Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.35.

Fig.37. Estructura de la β -ribofuranosa y su vector μ . Se calculó este isómero, por analogía con el enlace β -glucosídico que presentan los nucleótidos de adenina, la ADO y INO con el anillo de ribosa. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.35.





(a)

Fig.38. Estructura de la INO y su vector μ . a) Confórmero anti y b) Confórmero syn. Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.35.



(b)



Fig.39. Estructura de la HIPO y su vector μ . Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.35.

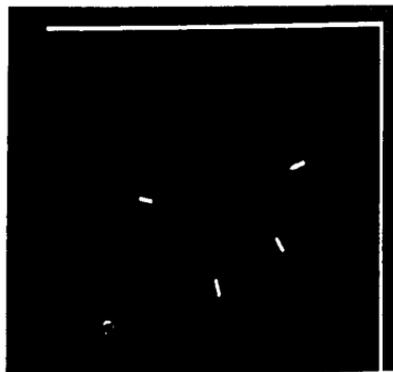


Fig.40. Estructura de la XAN y su vector μ . Las condiciones son las mismas que las referidas en la Fig.35.

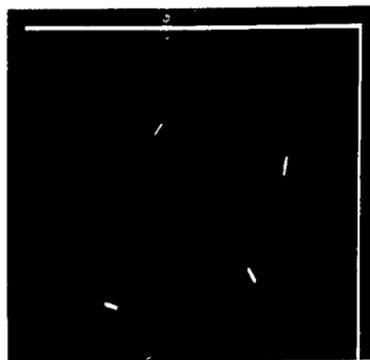


Fig.41. Estructura del AU y su vector μ . Las condiciones son las mismas

DIFERENCIA DE ENERGIA (ΔE) ENTRE HOMO Y LUMO

Anteriormente se mencionó que la magnitud de la diferencia de energía entre los orbitales frontera (HOMO y LUMO) de las moléculas es inversamente proporcional a su grado de reactividad. Por ello, al determinar este parámetro, es posible saber si una molécula determinada requiere experimentar una transición a un estado excitado para interactuar -y a veces reaccionar- con otra.

En la gráfica de ΔE (Fig.42), no se aprecian diferencias entre los diferentes moduladores probados, excepto para la ribosa que no posee dobles enlaces en su estructura molecular.

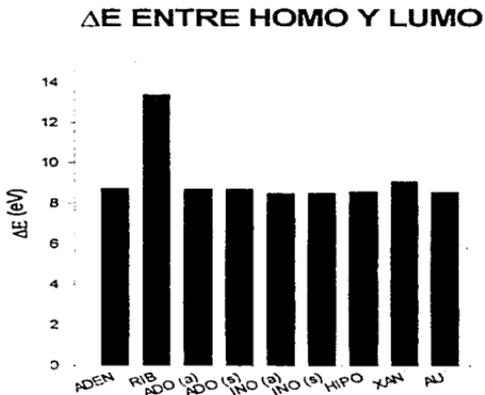


Fig.42. Gráfica de ΔE entre HOMO y LUMO para la ADO, sus catabolitos y la β -ribofuranosa. Siendo esta última la única que se muestra con una energía mayor debido a la carencia de dobles enlaces en su estructura molecular. La ΔE se obtuvo como otro de los parámetros que se obtienen al calcular el vector μ con MOPAC.

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

El orden de las secuencias y los métodos empleados para el análisis de predicción se enlistan a continuación:

- 1) Rya 1
- 2) Rya 2
- 3) Rya 3
- 4) Rya 4
- 5) Rya 5
- 6) p21

- 1) Chou-Fasman
- 2) Garnier
- 3) GGBSM
- 4) Novotny

donde:

T= Giro (Turn)
 α = Hélice Alfa
 β = Hoja Beta
 c= Estructura al Azar (Random Coil)
 W= Segmento Hidrofílico
 L= Segmento Lipofílico
 N= Segmento Neutro

Nota:

- 1) El número entre paréntesis que aparece a la izquierda de cada predicción corresponde al número, según el orden establecido, del método que se empleó.
- 2) La nomenclatura adoptada al presentar los resultados del método de Novotny debe entenderse como que la predicción permite proponer las dos posibilidades expresadas a ambos lados de la barra diagonal.

Rya 1

EGYSPYPGCG GFQWGGNG VGDDLYSYGF DGLHL WTGHV

T T T T T T T T	T T T T T T T T	T T T T T T T T		T T T T T T T T	T T	T T T T		
β T T c c c c T c	β β T T c c c c	c c c c c c c c c c		β β β β β β β β	β β β c	T β T β β		(1)
c c c c c c c c c c	c c c c c c c c c c	c c c c c c c c c c		c c c c α β β c c	c c α α β β c c c c			(2)
T/ β	T			T/ α				(3)
N/W	N/W			N/W				(4)

Rya 2

DGFLPVCSL GPGQVG HLN LGQDVSS LRFFAICGLQ

T T T	T T T	T T T T T T		T T T T T T	T T T T T T	T T T T T T		
T T β β β β c	c T T β β β	c c c c c c		β β β T β β β β	c c c c c c c c β α	α α β β β β β T c c		(1)
c c c c β c c c	c c c c c c	c c c c c c		c c c c c c c c β α	α α β β β β β c c c c			(2)
β /T	T/ β			α /T				(3)
L	W			L				(4)

Rya 3

PECFGPALR	GEGGSG	LLAAIEEAIR	ISEDPAR DGP	
TT TTTT	TT T T T T	T	TTTTT T T T T	(1)
TTT βββ ββ β	TTT c c c	α α α α α α α α	α α β c c T T T c c	(2)
c c c c c c c c c	c c c c c c	c α α α α α α α α	β β c c c c c c c c	(3)
α	T	α		(4)
L	W	L		

Rya 4

ADGGPFRPE	GAGGLG	DMGDTTPAEP	PTPEGSPILK	
TT T T T T T T T	T T T T	TT T T	T T T T T T	(1)
β T c c c β β β β	T T c c c β	β β β β c c c c c c	c c c T α α α α β	(2)
c c c c c c c c c	c c c c c c	c c c c c c c c c c	c c c c c c c c c c α	(3)
T/α	T	T/α		(4)
N	W	N		

Rya 5

EGSAAGDLA	GAGSGG	GSGWGSAGE	EAEGDEDENM	
TT	TT T T T T	TT T T T T	TT T T T T	(1)
α α α α α α α β β	β β β c c c	c c c c c c c c c c α	α α α α α α α α	(2)
c c c c c c c c c	c c c c c c	c c c c c c c c c c	c c c c c c c c c c α	(3)
α/T	T	T/β		(4)
N	N	N		

p21

MTEYKLVVV	GAGGVG	KSALTIQLIQ	NHFVDEYDPT	
	TT T T T T	T T T	TT T T T T	(1)
α α α α α β β β β	β β β c c c	β β β β β β β β	β β β β T T T c c α	(2)
c c c α β β β β β	c c c c c c	c c α α β β β β α	α α β β c c c c c c	(3)
β	T	α/β		(4)
L	W	L		

Los resultados de la predicción de estructura secundaria no muestran una clara concordancia entre los cuatro métodos; es decir, que mientras unos predicen un tipo de estructura, otros muestran predicciones diferentes, siendo las coincidencias escasas. De hecho el esquema que plantea el método de Novotny, es tan complejo que en varios casos se proponen dos tipos de estructura para un mismo segmento. Esta situación es relativamente común cuando se aborda el problema de la predicción de la estructura secundaria de las proteínas. Por ello, este tipo de análisis debe ser tomado con reserva, ya que en el mejor de los casos, sólo se ha llegado a predecir correctamente hasta el 60% de la estructura secundaria de una proteína.

No obstante de la discrepancia encontrada entre los métodos de predicción utilizados en este análisis, puede observarse, al menos, que los cuatro coinciden en proponer al motivo de glicinas como una asa o giro hidrofílica.

Otro de los factores que intervienen en el reconocimiento de ATP por parte de p21 es la presencia de un aminoácido cargado negativamente (Asp ó Glu) en la posición 15 después del motivo de glicinas, el cual forma puentes de hidrógeno con el hidroxilo unido al C2' del anillo de ribosa. Este aminoácido, a veces, aparece algo desplazado de esa posición en las secuencias del RyR (vease las secuencias de aminoácidos). En Rya 1 se ubica en la posición 11 ó 13, según el motivo que se considere, ya que en esta secuencia se tienen dos motivos en uno. En Rya 2 no se cuenta con ese residuo negativo. En Rya 3 y Rya 4, aparece en la posición 14 después del motivo de glicinas. La única que presenta el aminoácido en la misma posición que p21 es Rya 5.

DISCUSSION

MODULACION POR CARGA ENERGETICA (CE)

Cuando el músculo esquelético se contrae, se desencadenan diferentes procesos, entre los que podemos citar la hidrólisis de ATP que provee de la energía motriz para la contracción muscular. Como consecuencia de ello, la CE en el tejido disminuye y las rutas catabólicas, como la glucólisis, se activan para contribuir a regenerar el nivel de ATP y la CE.

Como otras funciones, la contracción muscular también se encuentra bajo regulación; en este caso, es la $[Ca^{+2}]$, la que rige el movimiento de los músculos; es decir, que la unión del Ca^{+2} a la troponina C es la que permite el desplazamiento de los filamentos musculares. Esta $[Ca^{+2}]$ es producto del flujo del calcio que entra o que sale de la célula y/o de reservorios internos. Un ejemplo de estos últimos, es el sistema membranoso, conocido como retículo sarcoplásmico, presente en el músculo esquelético. Incerto en esta membrana se encuentra el canal liberador de calcio o RyR; capaz de regular, junto con muchos otros elementos, la $[Ca^{+2}]$.

En el músculo esquelético, la liberación de calcio por el RyR se encuentra acoplada a una despolarización que se propaga por toda la membrana plasmática y que es finalmente captada y transmitida por otra proteína, el DHPR, que al estar en contacto directo con el RyR le transfiere un cambio conformacional que sirve como transductor de la señal eléctrica que permite la liberación de calcio.

El RyR, es susceptible de ser modulado por los nucleótidos de adenina individualmente. Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas, estos nucleótidos coexisten en una relación, definida como Carga Energética ($CE=0.9$), que tiende a reestablecerse siempre que es alterada por diferentes condiciones metabólicas (Atkinson, 1977). La coexistencia de los nucleótidos de adenina en la célula permite proponer que el RyR debe experimentar una modulación por la CE y no sólo por un nucleótido individual. Esta hipótesis encuentra su comprobación cuando al combinar los tres nucleótidos de adenina en las concentraciones que generan la CE en el nivel basal ($CE=0.93$), se observa la activación del RyR (Fig.21). Se sabe (Zarca y Shohan-Barmatz, 1993), que el ATP satura al RyR a concentraciones por arriba de 2 mM. Por ello, si se considera que la concentración de ATP encontrada en el nivel basal es de 9.51 mM, es necesario responder la pregunta sobre si es la CE la que ejerce la activación sobre el RyR, o bien se trata de un respuesta producto de la saturación de esta proteína alostérica. Para responder la pregunta se diluyó diez veces la concentración de cada nucleótido, pero manteniendo el valor de CE; es decir, la misma proporción entre los tres nucleótidos. En los resultados se observa no sólo la misma magnitud en la activación del RyR, sino también el mismo patrón de respuesta por parte de cada nucleótido individual (Fig.22) . Ello demuestra que la CE es capaz de modular al RyR.

Por otra parte, la potenciación (Fig.21) del AMP y del ADP sobre el efecto del ATP sugiere que aquellos primeros modulan alostéricamente, a su vez, la acción tanto del ATP como la de ellos entre sí.

De acuerdo con lo anterior, la modulación que ejercen los nucleótidos de adenina sobre el RyR presenta un patrón complejo. Sabiendo (Takeshima et al. 1989) que en el RyR se tienen, al menos 20 sitios que reconocen ATP, tal complejidad resulta razonable; esto es, que la ocupación azarosa de cada sitio debe dar lugar a diferentes estados conformacionales del RyR, los cuales, necesariamente, deben influir sobre la permeabilidad de los iones por el poro del canal.

En este trabajo se centra la atención en el estudio de la modulación de diferentes purinas. Sin embargo, no debe hacerse a un lado el hecho de que el RyR es susceptible de ser modulado por otros factores los cuales pueden influir en la modulación observada por los diferentes derivados de purina aquí probados.

Una vez que se ha demostrado que la CE puede modular al RyR (Fig.22), es posible ahondar en el estudio para averiguar si variaciones reales de la CE (producto de diferentes alteraciones metabólicas) ejercen alguna modulación sobre el RyR. Los resultados indican que sólo una disminución drástica de la CE es capaz de disminuir significativamente la activación del RyR (Fig.23). Con base en esto, en la demostración de que la modulación del RyR por los nucleótidos de adenina presenta un esquema complejo, en el hecho de que este canal está involucrado en la liberación de calcio para la contracción muscular y otros eventos metabólicos, y de algunos conceptos de la literatura (Walsh et al., 1991), es posible proponer un modelo general, basado en observaciones del de este sistema de estudio, para intentar explicar la sensibilidad de respuesta de los sistemas de regulación en los sistemas vivos:

En este modelo se establecen dos niveles jerárquicos (Fig.43). El Nivel I en donde se encuentran diferentes entidades reguladoras (generalmente proteínas) que son importantes en el desarrollo de determinados procesos o eventos ligados entre sí en forma seriada; esto es, que para que se realice un proceso, es necesaria la precesión de otro. Cada proceso en la serie siempre se encuentran bajo un funcionamiento normal. Además cada entidad reguladora se ve influenciado por diferentes factores moduladores, los cuales se ubican en el Nivel II. La sensibilidad (S) que muestra cada uno de las entidades reguladoras a las alteraciones fisiológicas que experimente el sistema, es inversamente proporcional al logaritmo base diez del número de factores (F) que modulan a la entidad reguladora y directamente proporcional al umbral (K) que cada entidad muestra frente a cada modulador. En este caso el umbral es la constante de proporcionalidad:

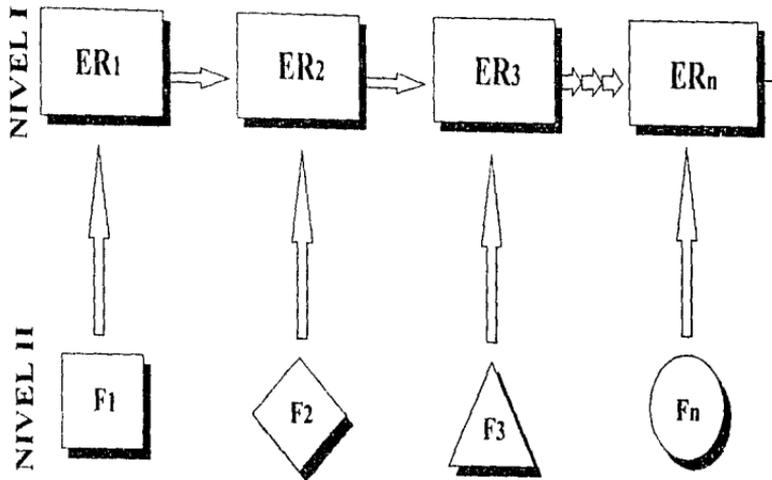


Fig.43. Esquema del modelo propuesto para explicar la sensibilidad que muestran los puntos de regulación (entidades reguladoras) involucrados en diferentes procesos vitales, frente a los cambios que ocurren en la fisiología de un individuo. En el Nivel I se ubican las entidades reguladoras (ER) (generalmente proteínas) importantes en el desarrollo de eventos ligados entre sí en forma seriada. Cada proceso en la serie siempre se encuentran bajo un funcionamiento normal. En el Nivel II se ubica el conjunto de los diferentes factores moduladores (F) de las entidades reguladoras, los cuales, además, pueden influir a otras entidades reguladoras. Si el número de estos aumenta, entonces la sensibilidad de respuesta a los cambios fisiológicos disminuye.

$$S \propto 1/\text{Log } F$$

ó bien

$$S = K/\text{Log } F$$

La razón de porqué se propone una función logarítmica, es que, de esa forma, se puede explicar mejor la condición de saturación de los sitios de reconocimiento de los diferentes moduladores de la entidad reguladora. Es decir, que cada entidad contiene un número finito de sitios de reconocimiento para un número finito de moduladores, por lo que debe llegar un momento en que aunque el NF se incremente indefinidamente, éstos ya no influyan sobre la entidad reguladora.

Considerando, ahora, los resultados obtenidos en este estudio, se tiene que el RyR es un punto importante en la homeostásis de la $[\text{Ca}^{+2}]$, que regula, a su vez, la contracción muscular. Es decir que el RyR es una entidad reguladora que es regulada por una gran variedad de moduladores. De ahí, entonces, que este receptor no presente una gran sensibilidad a las alteraciones de la CE , ya que existen otros factores como la fuerza iónica, el Mg^{+2} , la $[\text{Ca}^{+2}]$, e incluso el DHPR -que es otra entidad reguladora- que intervienen directamente en la modulación del RyR y que hacen, que dicha modulación observe un patrón muy complejo.

Existen otros sistemas como la glucólisis, cuyo punto de regulación más importante es la fosforilación de la fructosa-6-fosfato por acción de la fosfofructoquinasa, la entidad reguladora, que es modulada únicamente por los niveles de AMP , de ATP , la presencia de Mg^{+2} o de Mn^{+2} y de las mismas fructosa-6-fosfato y fructosa-1,6-bisfosfato. En este caso la fosfofructoquinasa muestra una mayor sensibilidad a las variaciones de la CE , en comparación al RyR , en virtud de que es modulada por un número mucho menor de moduladores.

Antes de continuar con la discusión, es muy importante aclarar que la validez del modelo descrito queda por confirmarse; de tal suerte que, por ahora, sólo se presenta como una simple propuesta.

Por otra parte, ya se ha demostrado y establecido repetidamente que la modulación del RyR por los nucleótidos de adenina es compleja. En apariencia, el principal activador y el principal contribuyente en el efecto observado por la CE es el ATP . Sin embargo, si se observa la Fig.24, la disminución de la CE provoca un abatimiento de un 30% en la activación del RyR , mientras que cuando se disminuye la concentración de ATP , en ausencia de los otros

nucleótidos, se ve que el abatimiento es de apenas un 12%. Es decir que, el abatimiento de la activación cuando la CE disminuye, no es de la misma proporción que el abatimiento de la activación debida a la sola disminución de la concentración del ATP. Esto permite llegar a la conclusión de que, en la modulación del RyR por la CE, no sólo el ATP está involucrado, sino que los otros dos nucleótidos también contribuyen a dicha acción. De hecho, si se retoman las observaciones de los tres nucleótidos por separado en el nivel basal (Fig.21), se puede establecer que el ATP es mejor activador que el AMP y éste que el ADP. Esto resulta lógico, si se piensa que las variaciones de la CE afectan con mayor sensibilidad a los niveles de AMP y de ATP (Atkinson 1977).

Por otra parte, existen algunos casos de enzimas que al plegarse forman una "bolsa" hidrofóbica que interactúa con la parte no polar del sustrato, la cual debe ajustarse correctamente a la bolsa para que se lleve a cabo la acción catalítica de la enzima. Si esto no ocurre, la catálisis disminuye o desaparece. Es decir, que el grupo funcional que va a ser modificado debe ajustarse al sitio catalítico de la enzima y el resto de la molécula debe ajustarse a otras porciones de la proteína. Este tipo de doble reconocimiento es la base de la especificidad de la mayor parte de las enzimas (Fessenden y Fessenden 1986). En el reconocimiento de un ligando por su receptor no existe transformación química alguna, pero el doble reconocimiento aún se conserva (Rodríguez, 1997); es decir, que toda la molécula del ligando es importante para ser reconocido por el receptor. Siguiendo con esta idea, la complejidad mostrada en la modulación del RyR por los nucleótidos de adenina se puede explicar al considerar la ubicación del aminoácido negativo (Asp ó Glu), que en p21 se encuentra en la posición número 30 (15 aminoácidos después del motivo de Gly). De esta manera, sabiendo que la diferencia estructural entre AMP, ADP y ATP se restringe a los grupos fosfato unidos al anillo de ribosa, se tiene que, por ejemplo, en Rya 1, en donde existen dos motivos de Gly en el mismo lugar, el Asp está desplazado hacia la posición 11 ó 13, según el motivo que se considere, después del censo de Gly. De ahí que se piense que al faltar uno o dos grupos fosfato - en relación al ATP- tal como ocurre con el ADP o el AMP, entonces le sea necesario al RyR recorrer a dicho aminoácido para que alcance a formar puentes de hidrógeno con el hidroxilo unido al C2' de la ribosa. Este desplazamiento del Asp también se observa en la secuencias Rya 3 y Rya 4. No así en Rya 5, lo cual hace pensar que este sitio reconoce preferentemente al ATP. En otras palabras, existen sitios en el RyR que al no ser los tradicionalmente reportados para el ATP, podrían reconocer al AMP y/o al ADP. La ocupación azarosa de ellos podría asociarse a diferentes estados conformacionales en el RyR.

Es importante advertir que, desde un punto de vista estructural, la modulación que los nucleótidos de adenina se ejerce como resultado de la interacción de las tres secciones (el anillo de adenina, el de ribosa y los grupos fosfato) que integran a su estructura molecular. Esto es, que estas tres

secciones requieren estar unidas covalentemente entre sí para activar al receptor (Fig.26). Ello obliga a pensar que las tres secciones están involucradas en su reconocimiento por parte del RyR.

A pesar de todo lo anterior, es necesario advertir que los resultados observados por cada nucleótido en forma individual, a una concentración de ≈ 1 mM, contradice la jerarquía de activación ya mencionada (Fig.25). Para aclarar la situación, es necesario construir curvas dosis-respuesta que permitan comprender con más detalle la modulación de cada nucleótido por separado, a fin de llegar a una conclusión más completa y confiable.

MODULACION POR ADO Y SUS CATABOLITOS

Analizando detenidamente la estructura de los nucleótidos de adenina (Fig.13), es posible visualizar tres secciones: Un anillo de adenina (un compuesto heterocíclico) unido mediante su N9 en posición β y formando un enlace N-glucosídico, al C1 de un anillo de D-ribofuranosa que, a su vez, se encuentra fosforilado en el C5. Siendo tan sólo el número de grupos fosfato unidos al monosacárido, el que hace la diferencia entre ATP (tres fosfatos), ADP (dos fosfatos) y AMP (un fosfato).

De la remoción de los grupos fosfato, el resultado obtenido es la molécula de la ADO; es decir, el anillo de adenina unido en posición β -anomélica con el de ribosa. En la Fig 19 se presentó la ruta de degradación que experimenta este nucleósido de adenina y los diferentes intermediarios que se obtienen a lo largo ella. Los cambios que observan entre cada catabolito se remiten a la unión con la ribosa o al estado de oxidación, pero el anillo de purina -aunque modificado- se conserva.

Los diferentes reportes en la literatura y los resultados obtenidos en este trabajo, han demostrado claramente que los nucleótidos de adenina modulan al RyR. Ahora bien, la similitud estructural entre dichos nucleótidos con la ADO, han permitido extender los estudios para determinar si el RyR es también capaz de reconocer y, consecuentemente, ser modulado por la ADO y por otros derivados de purina, como por ejemplo, los diferentes intermediarios del catabolismo de aquella primera. De hecho está bien establecido que la cafeína (una metilxantina) es un activador clásico del RyR que se utiliza para caracterizar a este receptor (Fleischer e Inui, 1989).

Los resultados señalan que esta modulación es posible. Sin embargo, los diferentes patrones de activación mostrados por cada catabolito (vease los resultados), hacen pensar que las modificaciones en sus respectivas estructuras son factores determinantes en la afinidad y en la manera como son reconocidos

por el RyR. Siguiendo con este razonamiento, es de esperar que los cambios estructurales en la molécula de cada catabolito alteren también sus propiedades fisicoquímicas. Así por ejemplo, la distribución de los electrones en cada molécula debe modificarse al cambiar el estado de oxidación y/o al estar presente o ausente el anillo de ribosa. La modificación en la distribución electrónica se manifiesta en cambios en la dirección y en la magnitud del vector momento dipolar (μ) de cada molécula. Ahora bien, la relevancia de saber hacia donde se orientan las nubes electrónicas, reside en que todas la moléculas interactúan entre si a través de sus electrones, ya sea para formar enlaces químicos o simplemente interacciones débiles como los puentes de hidrógeno - tan observados en las proteínas-. De esta forma, al determinar la orientación del vector μ , se determina la forma en como las moléculas se orientan para interaccionar entre si.

Partiendo desde la ADO hasta el AU se observan cambios en el patrón de activación los cuales coinciden con modificaciones en la distribución de los electrones. Es decir, que mientras en la ADO (Fig 35a, 35b) la densidad electrónica se orienta hacia la región ente el N1 y el C2 de anillo de adenina, en la INO (donde se ha oxidado el C6 y se ha eliminado el grupo amino inicial) se observa una orientación hacia la región entre el N7 y el C8 (Fig.38a, 38b). Siendo esto válido para ambos conformeros: el anti y el syn. Sin embargo debe notarse que en la INO la magnitud del vector μ aumenta al doble aproximadamente.

Si ahora se separa el anillo de adenina y el de ribosa, no se aprecia efecto modulador alguno, ni por separado, ni al mezclarlos en solución en los ensayos de unión específica. Analizando la dirección y la magnitud del vector μ para la adenina, se ve que no hay diferencia significativa con respecto a la ADO. Sin embargo, la modulación mostrada por ambas moléculas es muy diferente. Esto hace pensar que la unión covalente entre la adenina y la ribosa es importante para activar al RyR. En otras palabras, no sólo la distribución de los electrones es importante en la modulación del RyR, sino también factores de tipo estérico.

Con la HIPO, (cuando se elimina el anillo de ribosa) se observa que el patrón de activación cambia (Fig.30), haciéndose más discreto en comparación con los catabolitos anteriores (en donde si está presente la ribosa). No obstante, ni la magnitud ni la dirección del vector μ , comparado con la INO, muestran cambios significativos (Fig.39). Esto coincide con lo observado con la ADO y la adenina; es decir, que nuevamente la ribosa se hace importante en la activación del RyR.

Al efectuar una segunda oxidación sobre el C2 del anillo de purina; esto es, cuando se tiene la XAN, se observan dos cambios importantes: 1) una gran activación de seis veces sobre el control, nunca antes reportada (Fig.31) y 2) la magnitud del vector μ más grande (Fig.40) respecto a las purinas probadas en este estudio. Ambos hechos sugieren que, aparentemente, la XAN presenta la mejor distribución electrónica y la polaridad más adecuada para lograr la mejor activación del RyR.

Con el AU; es decir, cuando se oxida por tercera vez el anillo de purina en el C8, el patrón de activación (Fig.32) es similar pero mucho más discreto que el de la XAN. Si se analiza el vector μ y la estructura molecular del AU (Fig.41) se observa que el cambio en la dirección y en la magnitud de dicho vector se debe no sólo a esta tercera oxidación, sino también al aumento en la simetría de la molécula. Es decir que ocurre algo parecido a lo que se observa, por ejemplo, con la molécula del CO_2 , en donde los dos átomos de oxígeno electronegativo atraen hacia su vecindad los electrones, por lo que los efectos atractivos se compenstan en ambos lados y entonces no se genera ningún dipolo en la molécula. Este cambio en el vector μ coincide, entonces, con la disminución de la activación del RyR por parte del AU.

Resumiendo, al representar los vectores μ de cada molécula en un espacio cartesiano, se distinguen grupos naturales (Fig.44). Así por ejemplo, la ADO (ambos conformémeros) y la adenina presentan orientaciones y magnitudes del vector μ similares. Sin embargo, ya se ha comentado que los patrones de modulación para ambos derivados son muy diferentes, lo cual hace pensar que la unión covalente con el anillo de ribosa es necesario para que el RyR sea activado. Esto mismo se repite con la INO y la HIPO, en donde tampoco se observan diferencias significativas en el vector μ . Ambas situaciones sugieren entonces que, además de la distribución electrónica, los factores estéricos juegan un papel relevante en modulación del RyR.

Por otro lado, ya se ha planteado que la coincidencia entre la gran activación mostrada por la XAN y la mayor magnitud del vector μ , señalan que este derivado de purina presenta la mejor distribución electrónica y la polaridad adecuada para activar al RyR.

Para el AU, el cambio en la dirección y la magnitud del vector μ , se deben al aumento en la simetría debido a la tercera oxidación en el C8. Esto quiere decir que la distribución de los electrones se hace más homogénea en toda la molécula, lo cual, aparentemente, resulta ser un factor que disminuye -al menos en comparación con la XAN- la activación del RyR.

VECTOR MOMENTO DIPOLAR

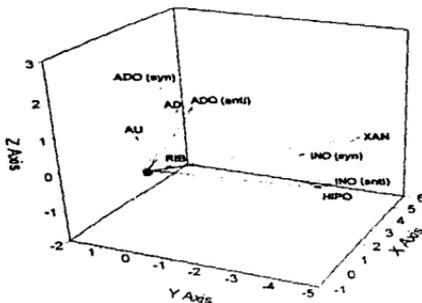


Fig.44. Espacio cartesiano donde se representa el conjunto de los vectores μ para la ADO y sus catabolitos. El punto del centro corresponde al origen: (0,0,0). Aunque el vector μ de la β -ribofuranosa (que no observó efecto alguno frente al RyR) apunta hacia la dirección de la XAN y la INO (syn); ésto debe ser tomado con reserva, ya que para ese monosacárido el sistema cartesiano se estableció de manera diferente a como se hizo en aquellas moléculas que contaban con el anillo purínico.

Hasta aquí, se ha planteado la correlación encontrada entre la modulación del RyR por diferentes purinas con su distribución electrónica y algunos otros efectos de tipo estérico. Sin embargo, al analizar más detenidamente esta correlación, es posible distinguir regiones en la estructura molecular de estas purinas que resultan más activas que otras. De esta manera, la ADO y la XAN (Figs.35a, 35b, 40), que presentan orientaciones electrónicas hacia, aproximadamente, la misma región (entre el N1, el C2 y el N3) son los derivados que muestran un efecto activador (Figs.27, 31) más importante en comparación al observado por la INO y la HIPO (Figs.29, 30), cuya orientación electrónica (entre el C6, el C5, el N7 y el C8) también es similar entre sí (Figs.38a, 38b, 39). A partir de esto, es posible pensar que la región comprendida entre el N1, el C2 y el N3 es más activa que la región delimitada por el C6, el C5, el N7 y el C8 del anillo purínico (Fig.45).

Ahora bien, si se considera el caso del AU, se observa que aunque presenta el mismo patrón de respuesta que la XAN (Figs.31, 32), el efecto es mucho menor, aún cuando en ambos casos los electrones se orientan hacia la misma región (Figs.40, 41). Si se le compara con la INO, se ve que, a la misma concentración (10 nM), el efecto activador se repite (Fig.29). Sin embargo, la



Fig.45. Estructura de la purina en donde se indica la zona que, según las curvas dosis-respuesta, observa más actividad (N1, C2, N3 y N9) y la que observa menor actividad (C6, C5, N7 y C8).

INO difiere del AU con respecto a la orientación electrónica (Fig.38a, 38b). Es decir, que al modificar la región entre el C6, el C5, el N7 y el C8 -en este caso con una oxidación- se disminuye la actividad del derivado purínico dando la impresión de que al alterar la región menos activa se modifica la actividad de la región más activa. Esto es lógico si se considera que, tal como se ha dicho anteriormente, los cambios en la estructura de las moléculas necesariamente influyen en la distribución de los electrones. Lo realmente interesante es que, precisamente, esta distribución electrónica es la responsable aparente de la modulación del RyR. En otras palabras, la activación del RyR puede ser controlada a voluntad por diferentes derivados de purina con tan sólo modificar su distribución electrónica.

Si lo anterior es cierto, entonces si se propicia la orientación electrónica hacia las zonas más activas de los derivados de purina con ayuda de sustituyentes electronegativos (electroattractores) como los halógenos, por ejemplo, se podría potenciar los efectos moduladores sobre el RyR de una forma controlada. Desde luego si se orienta la densidad electrónica hacia las regiones menos activas, entonces, se observará una tendencia a la disminución en la modulación del RyR.

No obstante de lo anterior, ya se ha demostrado que la situación es más compleja y que en la explicación de los hechos experimentales también están implicados otros factores como los estéricos. Así por ejemplo, aunque en principio puede objetarse la comparación del AU y de la INO en virtud de que esta última presenta en su estructura el anillo de ribosa; si se compara al AU con la ADO, se observa que ambos derivados presentan una activación (Fig.27, 32) de la misma magnitud a la misma concentración (10 nM), pero el patrón de respuesta es diferente; es decir que la manera en que son reconocidos por el RyR es diferente. En ambos casos la orientación electrónica es similar (Fig.35a, 35b, 41). A partir de esto se tiene entonces que aunque la distribución de los electrones permite controlar la activación del RyR por derivados purínicos, existen factores como los estéricos, manifestados sobre todo por la necesidad de la presencia del anillo de ribosa en algunos de los ejemplos analizados, que están implicados en el reconocimiento de esas sustancias por el RyR y en la modulación que ejercen sobre este canal liberador de calcio. Este argumento se refuerza si se considera nuevamente que aunque en la adenina la orientación de los electrones se dirige hacia la zona más activa, no se aprecia efecto activador alguno.

Siendo un poco más flexibles con el modelo anterior, es posible extender la zona más activa hasta el N9, aunque en este caso la contribución al aumento en la actividad de la región se debe más a los efectos estéricos ya mencionados.

En este contexto, se ha demostrado (Ijzerman *et al.* 1992) que los receptores de purinérgicos del tipo A1 reconocen preferentemente al conformero anti de ese nucleósido y otros derivados como la N6-ciclopentiladenosina y la N6-etil-8-ciclopentilaminoadenosina. El primero es un agonista; es decir, que imita la acción del ligante natural, en este caso la ADO, y el segundo es un agonista parcial, esto quiere decir que sólo imita parcialmente la acción de la ADO, lo cual puede interpretarse como una disminución en la actividad de ese ligante. Esta disminución cobra importancia si se considera que la N6-Etil-8-ciclopentilaminoadenosina presenta una modificación estructural en el C8 del anillo de purina, tal como el AU. Es decir que, aparentemente, al modificar al C8 ocurre una disminución en la actividad de los diferentes derivados de purina. Ahora bien, la explicación a dicha disminución propone que el gran volumen del sustituyente (la ciclopentilamina) en el C8 obliga al anillo de ribosa a adoptar, sin perder la conformación anti, una disposición espacial diferente a la realmente activa. Con ello se establece nuevamente y en una proteína diferente al RyR, la importancia de la ribosa en la actividad de los derivados de purina. Ahondando un poco más en el argumento, puede pensarse especulativamente que el nitrógeno de la ciclopentilamina unida en el C8 de la N6-etil-8-ciclopentilaminoadenosina bien puede cambiar, también la distribución de los electrones; es decir que, en tal caso, ambos factores, los estéricos y los electrónicos, juegan un papel importante en el reconocimiento de las purinas por las proteínas.

Continuando con esta línea de pensamiento, es probable que la disminución en la actividad del AU se deba también a que, a diferencia de la XAN, a pH7 la forma enólica del AU es la que predomina. De tal suerte que si se piensa en la XAN, que es la activadora más importante y a la que más se parece -desde el punto de vista estructural y de la actividad mostrada- el AU, como una aceptora de protones que puede formar puentes de hidrógeno (ya que se ha demostrado que los derivados probados en todo el estudio no se unen covalentemente al RyR) con los aminoácidos de la proteína, entonces, el AU actuaría como un donador, lo cual iría en detrimento de su actividad. Esto último adquiere relevancia si, además, se piensa que los aminoácidos que podrían estar involucrados en el reconocimiento de estas purinas podrían presentar cargas positivas, es decir que tenderían a actuar como donadores de protones para formar puentes de hidrógeno.

Al preguntarse si los sitios que reconocen ATP, son los mismo que reconocen a otras purinas, puede verse que la atenuación de la activación de la ADO por el ATP (Fig.34), sugiere que aquella primera puede ser reconocida por los mismos sitios que reconocen ATP; o bien, que por lo menos son sitios que se encuentran comunicados, ya sea de manera directa o a larga distancia, de tal suerte que pueden modularse entre sí (Fig.46).

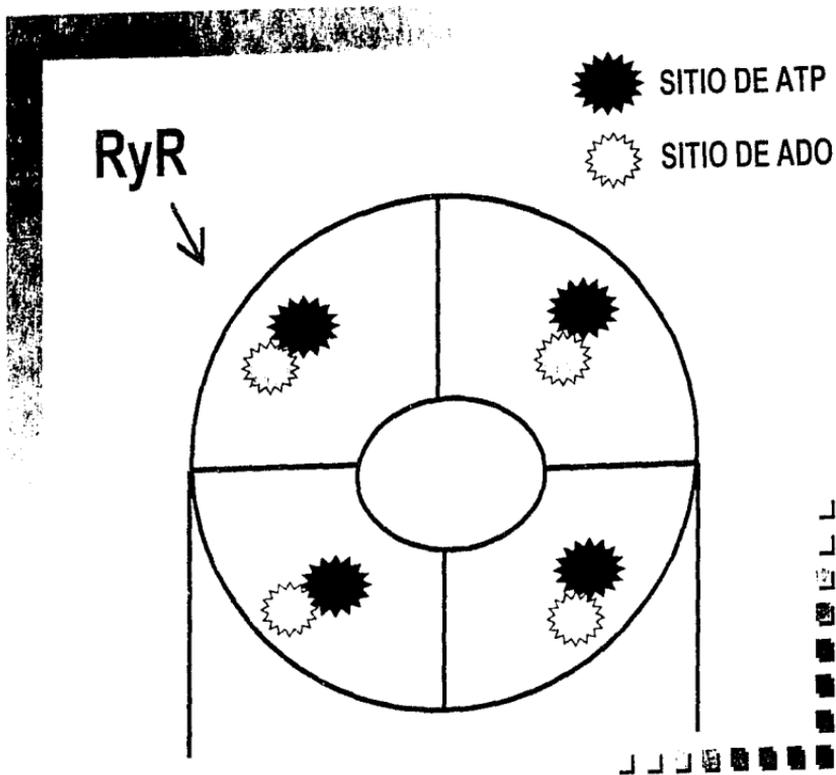


Fig.46 Esquema de la interacción entre los sitios de reconocimiento de ATP y ADO en el RyR.

A diferencia de lo que sucede con los nucleótidos de adenina, para la ADO y sus catabolitos, no se pudo encontrar un motivo característico como el de glicina para ATP que reconozca a estos moduladores. Por esta razón, no se realizó ningún estudio de predicción de estructura secundaria con la secuencia del RyR.

Por otra parte, en los últimos años (Löwdin, 1991), la diferencia de energía (ΔE) entre los orbitales frontera (HOMO y LUMO) ha sido un parámetro empleado como criterio de reactividad de diferentes compuestos que presentan actividad biológica. La importancia de este parámetro radica en poder determinar si dos moléculas requieren pasar por un estado excitado cuando se encuentran interaccionando entre sí. A pesar de esto, los resultados obtenidos en este estudio (Fig.42) sugieren, aparentemente, que los derivados de purina, no requieren experimentar la transición a un estado activado para ejercer su efecto modulador sobre el RyR. La discrepancia observada por la ribosa se explica porque que no presenta dobles enlaces conjugados como los derivados de purina.

No obstante de lo anterior, debe considerarse que cuando dos moléculas se acercan entre sí para interaccionar, los orbitales moleculares se modifican y se orientan o se polarizan para formar enlaces o interacciones débiles, esto hace que la ΔE también se altere. Es decir, que si bien los resultados de este estudio no indican diferencias importantes entre las moléculas probadas, ello no quiere decir que al complicar el cálculo considerando los diferentes factores (solvatación, polarizabilidad de los orbitales moleculares, pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) no se encuentren diferencias que permitan explicar la diferente actividad que han mostrado las moléculas utilizadas en este estudio.

CONCLUSIONES

El análisis y la interpretación de los resultados obtenidos a lo largo de este estudio, han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. El procedimiento seguido para aislar el retículo sarcoplásmico pesado, es adecuado para obtener fracciones ricas en RyR.
2. La modulación de los nucleótidos de adenina, en condiciones fisiológicas, presenta un patrón complejo de modulación sobre el RyR.
3. La Carga Energética es capaz de activar al RyR y sólo variaciones drásticas de ésta, provoca un abatimiento significativo de la activación del RyR. Esta situación, a su vez, permite proponer un modelo para explicar la sensibilidad que muestran los puntos de regulación (entidades reguladoras) involucrados en diferentes procesos vitales, frente a los cambios que ocurren en la fisiología de un individuo.
4. Se predice que la estructura secundaria del motivo de glicinas propuesto para el reconocimiento de ATP, corresponde a una asa hidrofílica. Esto coincide con la propuesta hecha para otra proteína (p21) que también presenta ese motivo y reconoce ATP.
5. Desde un punto de vista estructural, la unión covalente entre el anillo de adenina, el de ribosa y los grupos fosfato que forman a los nucleótidos de adenina, es necesaria para que éstos ejerzan su efecto modulador sobre el RyR.
6. La adenosina y sus catabolitos son moduladores del RyR y son reconocidos, ya sea por los mismos sitios que reconocen ATP o por sitios que se encuentran comunicados, directamente o a larga distancia, con los de ATP.
7. La activación del RyR por los derivados de la ADO depende de la presencia de la ribosa, de la orientación y magnitud del vector momento dipolar y de la simetría de la molécula.
8. La estructura de los derivados de purina probados, puede dividirse en dos secciones que observan actividades diferenciales sobre la activación del RyR.
9. Aparentemente, la ADO y sus catabolitos no requieren experimentar la transición a un estado excitado para ejercer sus efectos moduladores sobre el RyR.

PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo, han abierto la posibilidad a nuevos experimentos los cuales permitirán proponer y profundizar nuevos objetivos complementarios a este estudio. A continuación se enumeran algunas de las metas planteadas para la continuación de este proyecto de investigación:

A Corto Plazo

- Construir las curvas dosis-respuesta para los tres nucleótidos de adenina, con el fin de entender de manera más completa su modulación sobre el RyR
- Construir las curvas dosis-respuesta para otros derivados de purina para definir con mayor precisión la manera en como modulan al RyR desde un punto de vista molecular. Particularmente, el uso de derivados de xantina, como la cafeína, la teofilina, la teobromina, etc., será de gran valor debido, sobre todo, a la gran activación mostrada por la xantina.

A Mediano Plazo

- Realizar experimentos en donde se incorpore al RyR en bicapas lipídicas artificiales para medir su actividad unitaria bajo las condiciones probadas en este estudio, con el objeto de reforzar y profundizar las observaciones hechas en los ensayos de unión específica con [³H]-ryanodina.
- Aplicar los mismos cálculos teóricos para las nuevas moléculas por probar, para lograr explicar, con mayor precisión, la actividad mostrada por las purinas al modular al RyR.

A Largo Plazo

- Realizar experimentos de mutagénesis dirigida que permitan establecer cuales son las regiones del RyR involucradas en el reconocimiento de las purinas.
- Establecer un modelo molecular que explique la dinámica de la interacción de las purinas con el RyR.
- Comprobar el modelo propuesto en este estudio para explicar la sensibilidad de respuesta de los centros reguladores de diferentes procesos vitales ante los cambios fisiológicos en un individuo.

LITERATURA CITADA

- Abramson, J.J. *et al.* **Heavy Metals Induce Rapid Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum Vesicles Isolated from Skeletal Muscle.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80: 1526-1530, (1983).
- Atkinson, D.E. **Cellular Energy Metabolism and Its Regulation.** Academic Press Inc. Caps. 4 y 7, pp. 85-107, 201-224, (1977).
- Brilantes, A.M. *et al.* **Stabilization of Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Function by FK506-Binding Protein.** Cell, 77: 513-523, (1994).
- Butanda, A., Cañedo, R., Martínez, T. y Díaz M. **Entendiendo los Canales Iónicos de Membranas Celulares. Un Enfoque Multidisciplinario.** Psiquis (México), 5: 34-50, (1996).
- Catterall, W.A. **Excitation-Contraction Coupling in Vertebrate Skeletal Muscle: a Tale of Two Calcium Channels.** Cell 64: 871-874, (1991).
- Chagoya de Sánchez, V., Bruner A. y Piña, E. **In Vivo Modification of the Energy Charge in the Liver Cell.** Biochem. Biophys. Res. Comm., 46: 1441-1445, (1972).
- Chagoya de Sánchez, V. **Circadian Variation of Adenosine and of its Metabolism. Could adenosine be a Molecular Oscillator for Circadian Rythms?** Can. J. Physiol. Pharmacol. 73:339-355, (1994).
- Chu, A. *et al.* **Ryanodine as Probe for the Functional State of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release Channel.** Mol. Pharmac., 37: 735-741, (1990).
- Cruz-Garritz, D., Chamizo, J.A. y Garritz, A. **Estructura Atómica. Un Enfoque Químico.** Fondo Educativo Interamericano, México, Cap.6, pp.382-390, (1986).
- Eckert, R. y Raldall, D. **Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones.** 3ra. ed. Interamericana/McGraw-Hill. Madrid, pp 330,335; (19992).
- Favero, T.G., Zable, A.C. y Abramson, J.J. **Hydrogen Peroxides Stimulates the Ca²⁺ Release Channel from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum.** J. Biol. Chem., 270: 25557-25563, (1995).

- Ferris, C.D., Haganir, R.L. y Snyder, S.H. **Calcium Flux Mediated by Purified Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor in Reconstituted Lipid Vesicles is Allosterically Regulated by Adenine Nucleotides.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2147-2151, (1990).
- Fessenden, R.J. y Fessenden, J.S. **Química Orgánica.** Grupo Editorial Iberoamérica, México, Cap. 19, pp. 886-888, (1986).
- Fleischer, S. *et al.* **Localization of Ca²⁺ Release Channels with Ryanodine in Junctional Terminal Cisternae of Sarcoplasmic Reticulum of Fast Skeletal Muscle.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7256-7259, (1985).
- Fleischer, S. e Inui, M. **Biochemistry and Biophysics of Excitation-Contraction Coupling.** Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 18: 333-364, (1989).
- Franzini-Armstrong, C. **Studies of the Triad: Structure of the Junction in Frog Twitch Fibers.** J. Cell. Biol., 47: 488-499, (1970).
- Fuentes O. *et al.* **Calcium-Dependent Block of Ryanodine Receptor Channel of Swine Skeletal Muscle by Direct Binding of Calcium.** Cell Calcium., 15: 305-316, (1994).
- Furuichi, T *et al.* **Primary Structure and Functional Expression of the Inositol 1,4,5-Triphosphate-Binding Protein P₄₀₀.** Nature, 342: 32-38, (1989).
- Hain, J. *et al.* **Phosphorylation Modulates the Function of the Calcium Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum from Skeletal Muscle.** Biophys. J. 67: 1823-1833, (1994).
- Hamilton, S.L. *et al.* **[³H]-PN200-110 and [³H]-Ryanodine Binding and Reconstitution of Ion Channel Activity with Skeletal Muscle Membranes.** Anal. Biochem., 183: 31-41, (1989).
- Hawkes, M.J., Díaz-Muñoz, M. y Hamilton, S. **A Procedure for Purification of the Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle.** Memb. Biochem., 8:133-145, (1989).
- Hawkes, M.A., Nelson, T.E. y Hamilton, S. L. **[³H]-Ryanodine as Probe of Changes in the Functional State of the Ca²⁺-Release Channel in Malignant Hyperthermia.** J. Biol. Chem., 267: 6702-6709, (1992).

- **Hermann-Frank, A. y Varsányi, M. Enhancement of Ca⁺² Release Channel Activity by Phosphorylation of the Ryanodine Receptor.** FEBS. 332: 237-242, (1993).
- **Ijzerman, A. et al. Molecular modeling of adenosine Receptors. I. The Ligand Binding Site on the A₁ Receptor.** Drug. Design Disc. 9:49-67, (1992).
- **Krengel, U. et al. Three-Dimensional Structures of H-RAS p21 Mutants: Molecular Basis for their Inability to Function as Signal Switch Molecules.** Cell, (Cambridge, Mass.), 62: 539-548, (1990).
- **Laemli, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T.** Nature, 227:680-685, (1970).
- **Leeson, T.S., Leeson C.R. y Paparo, A.A. Texto/Atlas de Histología.** Interamericana/McGraw-Hill, México, pp. 237,240; (1988).
- **Liu, G. y Pessah, I. Molecular Interaction between Ryanodine Receptor and Glycoprotein Triadin Involves Redox Cycling of Functionally Important Hyperreactive Sulfhydryls.** J. Biol. Chem., 269: 33028-33034, (1994).
- **Löwdin, P. Molecular Structure Calculations.** en Lerner, R.G. y Trigg, G.L. ed. **Encyclopedia of Physics.** 2da. ed., VCH Publishers Inc., New York, pp.753-761, (1991).
- **Lowry, O.H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.** J. Biol. Chem. 193: 265-275, (1951).
- **Mahler, H.R. y Cordes, E.H. Biological Chemistry.** Harper and Row, New York, pp.124-131, (1966).
- **Martin, D.W., Mayers, P.A. y Rodwell, V.W. Bioquímica de Harper.** 9na. de. El Manual Moderno S.A. de C.V., México, pp. 338, 343, (1984).
- **Marty, I. et al. Transmembrane Orientation of the N-Terminal and C-Terminal Ends of the Ryanodine Receptor in the Sarcoplasmic Reticulum of Rabbit Skeletal Muscle.** Biochem. J., 298: 743-749, (1994).
- **Meissner, G. Ryanodine Activation and Inhibition of the Ca⁺² Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum.** J. Biol. Chem. 261: 6300-6306, (1986).
- **Meyers, M.B. et al. Association of Sorcin with the Cardiac Ryanodine Receptor.** J. Biol. Chem., 270: 26411-26418, (1995).

- Nicholls, J.G., Martin, A.R. y Wallace B.C. **From Neuron to Brain**. 3th. ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, Cap. 8, pp. 265-266. (1992).
- Olsson, R.A. **Adenosine Receptors on Vascular Smooth Muscle**. en Berne, R.M. Rall, T. W. y Rubio, R. eds. **Regulatory Function of Adenosine. Proceedings of the International Symposium on Adenosine, Charlottesville, Virginia, June 7-11, 1982**. Martinus Nijhoff Publishers. Boston. pp. 33-47. (1983).
- Rodríguez, A. **Caracterización del Sitio de Glicina Insensible a Estricnina en la Retina**. Tesis Lic. Biología. UNAM. México. 53pp., (1997).
- Salama, G. y Abramson, J.J. **Silver Ions Trigger Ca²⁺ Release by Acting the Apparent Physiological Release Site in Sarcoplasmic Reticulum**. J. Biol. Chem., 259: 13363-13369. (1984).
- Schulte, P.M. Moyes, C.D. y Hochachka, P.W. **Integrating Metabolic Pathway in Post-Exercise Recovery of White Muscle**. J. Exp. Biol., 166: 181-195. (1992).
- Serysheva I.I. *et al.* **Electron Cryomicroscopy and Angular Reconstitution used to Visualize the Skeletal Muscle Calcium Release Channel**. Struct. Biol. 2: 18-24. (1995).
- Sleumer, H. O. **Flacourtiaceae**. Flora Neotropica. Monografía No. 22: 1-207 (1980).
- Sorrentino, V. y Volpe, P. **Ryanodine Receptors: How Many, Where and Why?**. TIPS, 14: 98-103. (1993).
- Suko, J. *et al.* **Phosphorylation of Serine 2843 in Ryanodine Receptor-Calcium Release Channel of Skeletal Muscle by c-AMP, c-GMP and CaM-Dependent Protein Kinase**. Bioch. Biophys. Acta, 1175: 193-206. (1993).
- Takeshima, H. *et al.* **Primary Structure and Expression from Complementary DNA of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor**. Nature, 339: 439-445. (1989).
- **The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 11ra. ed., (1989).

- Trimm, J.L., Salama, G. y Abramson, J.J. **Sulfhydryl Oxidation Induces Rapid Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum Vesicles.** *J. Biol. Chem.*, 261: 16092-16098, (1986).
- Voet, D. y Voet, J. G. **Biochemistry.** John Wiley and Sons, New York, Cap. 34, pp. 1118-1130, (1990).
- Walsh, D.A. et al **Motifs of Protein Phosphorylation and Mechanisms of Reversible Covalent Regulation.** *Physiol. Rev.* 71: 285-303, (1991).
- Ward, D.J. *et al.* **Approaches to Peptide Drug Design. en Peptide Pharmaceuticals. Approaches to the Design of Novel Drugs.** Ward, D.J. ed. Open University Press. Buckingham, Cap. 4, pp. 83-134, (1991).
- Wayne, S.R., Zhang, L. y MacLennan, D.H. **Characterization of Ca⁺² Binding and Regulatory Site in the Ca⁺² Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* 267: 23318-23326, (1992).
- Wayne, S.R. y MacLennan, D.H. **Identification of Calmodulin-, Ca⁺², and Ruthenium Red- Binding Domains in the Ca⁺² Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* 269: 22698-22704, (1994).
- Wirenga, R.K. y Hol, W.G.J. **Predicted Nucleotide-Binding Properties of p21 Protein and Its Cancer-Associated Variant.** *Nature*, 302: 842-844, (1983).
- Witcher, D.R. *et al.* **Unique Phosphorilation Site on the Cardiac Ryanodine Receptor Regulates Calcium Channel Activity.** *J. Biol. Chem.*, 266: 11144-11152, (1991).
- Wojcikiewicz, R.J.H. **Type I, II and III Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptors Are Unequally Susceptible to Down-Regulation and Are Expressed in Markedly Different Proportions in Different Cell Types.** *J. Biol. Chem.*, 270: 11678-11683, (1995).
- Woods, H.F., Eggleston, L.V. y Krebs, H.A. **The Cause of Hepatic Accumulation of Fructose 1-Phosphate on Fructose Loading.** *Biochem. J.*, 119: 501-510, (1970).
- Zarka, A. y Shoshan-Barmatz V. **Characterization and Photoaffinity Labeling of the ATP Binding Site of the Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle.** *Eur. J. Biochem.* 213: 147-154 (1993).