

El plaguicida glifosato incrementa la V_{max} de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de eritrocito humano sin afectar su afinidad (K_m) por el sustrato

The pesticide glyphosate increases the V_{max} of the Ca^{2+} -ATPase from plasma membrane of human erythrocyte without affecting its affinity (K_m) for the substrate

MANUEL ARELLANO-CARRILLO¹, JAVIER VARGAS-MEDRANO^{1,2}, JORGE A. SIERRA-FONSECA^{1,3}
Y FERNANDO PLENGE-TELLECHEA^{1,4}

Recibido: Septiembre 11, 2011

Aceptado: Febrero 9, 2012

Resumen

Los plaguicidas son un amplio grupo de sustancias heterogéneas que producen un beneficio mediante la disminución de vectores que transmiten enfermedades, y en el control de plagas que afectan la producción agrícola. En el presente trabajo estudiamos el efecto del glifosato (GF) sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} de membrana (PMCA) de eritrocito humano en su forma nativa (sin calmodulina [CaM]) o en el complejo activo CaM-PMCA. Nuestros resultados evidenciaron que el GF produjo un efecto dual, estimulador e inhibitorio, y el efecto fue dosis-dependiente: concentraciones bajas de GF (0.05-0.1 mM) estimularon la hidrólisis de ATP por PMCA en su conformación nativa en un 62.5%, y en el complejo activo por CaM el incremento fue de tan solo del 20% (basados en sus respectivos controles sin GF). Ambas formas conformaciones de PMCA fueron parcialmente inhibidas con GF 0.3-0.5 y 0.4-0.5 mM. El análisis sobre el efecto de GF en la afinidad de la enzima por el sustrato (ATP), mostró que GF fue capaz de incrementar significativamente el consumo de ATP (V_{max}), pero solo para la conformación nativa de PMCA. Sin embargo, la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m) no fue afectada en ninguna de las dos conformaciones de PMCA. En conclusión, GF afecta la velocidad del ciclo catalítico de PMCA sin afectar su afinidad por el sustrato, ello puede deberse a una interacción del plaguicida con el C-terminal de PMCA. Este efecto, pudiera ocasionar disturbios sobre la homeostasis celular del calcio desencadenando la activación de procesos celulares tales como la apoptosis.

Palabras clave: ATPasa de Ca^{2+} , membrana plasmática, glifosato, calmodulina, eritrocito humano.

Abstract

Pesticides are a broad group of heterogeneous substances with great benefit to the human population, as they are used for decreasing or killing a broad number of pests involved in transmission of diseases or involved in decreasing the levels of food production. In this work we studied the effect of glyphosate (GF) over the hydrolytic activity of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) from human erythrocytes, either in their native conformational state (without calmodulin [CaM]) or in the active complex CaM-PMCA. Our results showed that GF produced a dual effect, activation and inhibition, and the effect was a dose-response effect: at low-concentrations of GF (0.05-0.1 mM), ATP hydrolysis mediated by PMCA was stimulated up to 62.5%, however with CaM the increase was only 20% (with respect to the controls without GF). Both conformational forms of PMCA were partially inhibited with GF 0.3-0.5 and 0.4-0.5 mM respectively. An analysis performed on PMCA affinity for the substrate (ATP) showed that GF was significantly increasing the ATP consumption (V_{max}) and it was only significant for PMCA in their native conformation. However, for the two conformations studied, GF was unable to significantly affect the affinity of PMCA for the substrate ATP (K_m). In conclusion, GF affects the velocity of the PMCA's catalytic cycle without affecting its affinity for ATP, and this may be due to an interaction between GF and the C-terminus of PMCA. This effect may disturb calcium homeostasis in the cell, leading to the activation of several cellular processes such as apoptosis.

Keywords: Ca^{2+} -ATPase, plasma membrane, glyphosate, calmodulin, human erythrocyte.

¹ Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, Chihuahua, México. 32310.

² Center of Excellence for Infectious Diseases, Biomedical Sciences Department, Texas Tech University Health Science Center and Paul L. Foster School of Medicine, El Paso, TX, U.S.A. 79905.

³ Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, TX, U.S.A. 79968.

^{2,3} Dirección actual de permanencia.

² Dirección electrónica del autor de correspondencia: fplenge@uacj.mx.

Introducción

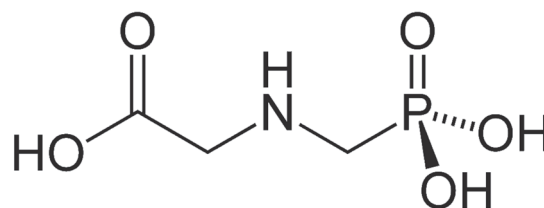
El glifosato (GF) o *N*-fosfonometilglicina (Figura 1) es un herbicida organofosforado (OF) de amplio espectro y uno de los más utilizados a nivel mundial. Este plaguicida se ha empleado para eliminar malezas en cultivos agrícolas del mundo (Baylis, 2000). El GF es también conocido comercialmente como Roundup®, el cual es de uso popular desde su comercialización en 1974, ya que se distribuye en más de 100 países por una gran variedad de fabricantes (Williams *et al.*, 2000).

La exposición a plaguicidas está normalmente asociada a efectos crónicos en la salud, lo cual reduce la calidad de vida (Dalvie *et al.*, 2003; Plenge-Tellechea and Vargas-Medrano, 2003). Además, el GF es el segundo agroquímico más utilizado en hogares y jardines del mundo, ya que se calcula que en casa y jardín se utilizan alrededor de 5 millones de litros por año y su mal manejo puede provocar la intoxicación del usuario (Garry *et al.*, 1989; Garry *et al.*, 1992; Kiely *et al.*, 2004). Múltiple evidencia científica ha demostrado que algunos OFs, tales como el diazinón, se acumulan en diversos tejidos lo que provoca alteraciones en la bioquímica normal de las células (Dikshith *et al.*, 1975, Castillo-Sosa, 2009). Por otra parte, se ha reportado que el GF puede ser nocivo para la salud ya que produce daños genéticos en sangre, hígado y riñones (Bolognesi *et al.*, 1997; Lioi *et al.*, 1998a; Peluso *et al.*, 1998). Aun más, se ha demostrado que los OFs inhiben la síntesis de proteínas y con ello se refrenda el modelo de acción de los OFs, de manera que pueden afectar múltiples vías bioquímicas (Marinovich *et al.*, 1994).

Normalmente los OFs, aunque son miscibles con agua, suelen ser moléculas con cierta tendencia hidrofóbica y pueden alterar la actividad enzimática de algunas proteínas funcionales de membrana, tal como la ATPasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} de membrana plasmática de eritrocito de cerdo, donde se ha reportado que algunos OFs interactúan directamente con la enzima o membrana plasmática a la cual se encuentra anclada la ATPasa (Blasiak, 1995). Estos compuestos con cierta tendencia hidrofóbica actúan directamente

sobre regiones no polares de proteínas, que son regiones en las proteínas de membrana que se encuentran en contacto con los lípidos de la membrana plasmática. Este tipo de interacción modifica la actividad enzimática de múltiples proteínas de membrana, incluyendo la de diversas ATPasas (Antunes-Madeira and Madeira 1990).

Figura 1. Estructura química del organofosforado glifosato ($C_3H_8NO_5P$) (Fuente: PubChem Substance ID 3496)



Sobre el efecto de GF hacia las enzimas podemos destacar: acetilcolinesterasas, lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasas, alanina aminotransferasas, fosfatasa alcalina, complejos mitocondriales y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Lioi *et al.*, 1998b; El-Demerdash *et al.*, 2001; Peixoto, 2005). Los eritrocitos humanos poseen mecanismos bioquímicos muy específicos para mantener bajos sus niveles de Ca^{2+} intracelular. Entre los que se destacan, la permeabilidad de membrana plasmática, el transporte pasivo de Ca^{2+} y los múltiples mecanismos intracelulares vinculados a la unión de Ca^{2+} (Roufogalis, 1979). Sin embargo, el Ca^{2+} libre del citoplasma de las células es regulado a través de una bomba de Ca^{2+} (Carafoli, 1991). Estructuralmente, la ATPasa dependiente de Ca^{2+} de membrana

plasmática (PMCA) es una proteína de membrana con 10 dominios transmembranales, los cuales son utilizados para anclarse a la membrana plasmática y poseen como característica particular ambos extremos amino y carboxilo orientados hacia el citoplasma. PMCA fue purificada por primera vez en 1979 de membranas de eritrocito y más tarde fue reconstituida en su forma funcional (Niggli *et al.*, 1979a; Penniston *et al.*, 1988). PMCA regula pequeñas concentraciones de Ca^{2+} citosólico mediante la expulsión de Ca^{2+} hacia el medio extracelular mediante la hidrólisis de ATP. Diversas fuentes afirman que PMCA mantiene la concentración de Ca^{2+} citosólico alrededor de 100 nM (Carafoli, 1991). PMCA puede a su vez ser estimulada por una pequeña proteína citosólica de alta afinidad por Ca^{2+} denominada calmodulina (CaM) (Lynch and Cheung, 1979; Niggli *et al.*, 1979a), por fosfolípidos ácidos o proteólisis (Benaim *et al.*, 1984).

Según la literatura, la mayoría de los estudios demuestran que CaM y PMCA interactúan con una estequiometría 1:1 y 2:1 en estudios realizados con enzima (PMCA) purificada (Hinds and Andreasen, 1981; Niggli *et al.*, 1982; Carafoli, 1991). CaM interactúa directamente con el carboxilo terminal de PMCA produciendo un aumento en la velocidad de reacción enzimática (V_{max}) que propicia una disminución de la K_m para el sustrato fosforilante (Carafoli, 1991). Debido a ello, proporciona mayor afinidad por Ca^{2+} y aumenta el transporte de Ca^{2+} hacia el medio extracelular, disminuyendo los niveles de Ca^{2+} libre en el citoplasma. Solo en muy pocos casos se ha establecido una relación entre un efecto sobre PMCA y una patología (Nicotera *et al.*, 1989; Mody and MacDonald, 1995). Genéticamente, se ha demostrado por medio de algunos modelos de ratones transgénicos carentes de la expresión de PMCA4, que la ausencia de esta enzima no repercute en el fenotipo, sin embargo, los ratones son infértiles y algunas de sus células tienen tendencias de apoptosis (Okunade *et al.*, 2004).

Seleccionamos la membrana de eritrocito humano como un sistema modelo *in vitro* debido a la ausencia de otras ATPasas transportadoras de Ca^{2+} que pudieran intervenir con el estudio. Recientemente publicamos evidencia donde se observa que el GF estimula la hidrólisis del ATP por PMCA (Vargas-Medrano *et al.*, 2011), sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual afecta la actividad hidrolítica de esta enzima. Las evidencias indican que GF representa un riesgo a la salud pública, por lo que son necesarios más estudios para evaluar estos riesgos. Mediante una metodología bioquímica *in vitro*, estudiamos cómo es que el glifosato estimula la actividad enzimática de PMCA en su forma nativa o en presencia de su activador fisiológico CaM, la cual induce un cambio conformacional prominente en PMCA. Por primera vez se propone mediante un modelo sencillo una contribución al mecanismo de acción del GF sobre PMCA.

Materiales y métodos

Reactivos químicos. El glifosato (glyphosate-ammonium) (CAS: 1071-83-6), adenosina 5'-trifosfato (ATP), $MgCl_2$, K_2HPO_4 y calmodulina de cerebro bovino (CaM) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (México). $CaCl_2$ grado analítico fue adquirido en J. T. Baker (México). Otros reactivos empleados en esta investigación fueron de grado reactivo.

Material biológico. Membranas plasmáticas de eritrocitos humanos fueron purificadas de paquetes caducos de sangre humana y fueron donados por el Hospital General de Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

Extracción de membranas fantasmas de eritrocito humano. El procedimiento de extracción de membrana plasmática libre de calmodulina y hemoglobina se llevó a cabo en cuarto refrigerado a 4 °C, de acuerdo al método descrito por Niggli *et al.* (1979a). Al final del procedimiento, las membranas plasmáticas de eritrocito se resuspendieron en Mops- K^+ 10 mM, pH 7.4 (~300 mg de proteína de membrana

total). Las membranas (fantasmas) fueron almacenadas en alícuotas de 1 ml en un congelador a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Determinación de la concentración total de proteína. En los experimentos realizados se utilizaron concentraciones constantes de proteína total indicada propiamente en cada uno de los experimentos. La concentración de proteína total de las membranas plasmáticas se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951). Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino.

Actividad enzimática específica de PMCA. La actividad hidrolítica de PMCA se realizó mediante un método colorimétrico, donde se cuantificó la aparición de fosfato inorgánico (P_i) liberado durante la hidrólisis del ATP por PMCA. Este procedimiento fue descrito por Lanzetta *et al.* (1979). El agente estabilizante Sterox se sustituyó por Tween 20 al 0.18% (v/v), tal como describen Baykov *et al.* (1988). La reacción enzimática se desarrolló a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un medio que contenía: Mops 30 mM (pH 7.2), KCl 130 mM, $MgCl_2$ 3 mM, EGTA 0.5 mM, $CaCl_2$ 0.5 mM (Ca^{2+} libre 10 μM), 0.12 mg prot/ml y CaM 2 μg /ml cuando se indica. Las reacciones enzimáticas se iniciaron tras adicionar ATP 1 mM al medio de reacción. Para las medidas dependientes de ATP se utilizaron concentraciones en el intervalo de 0.001-10 mM. Las concentraciones utilizadas del GF fueron de 0.05-0.5 mM. Los análisis estadísticos se realizaron por medio del programa Sigma Plot versión 11. Todos los experimentos se reportan como media \pm error estándar de tres experimentos independientes. La ecuación de Michaelis-Menten ($v = V_{max} [S] / K_m [S]$) se cargó en el programa computacional Sigma-Plot para el posterior análisis de cinética enzimática de nuestros experimentos.

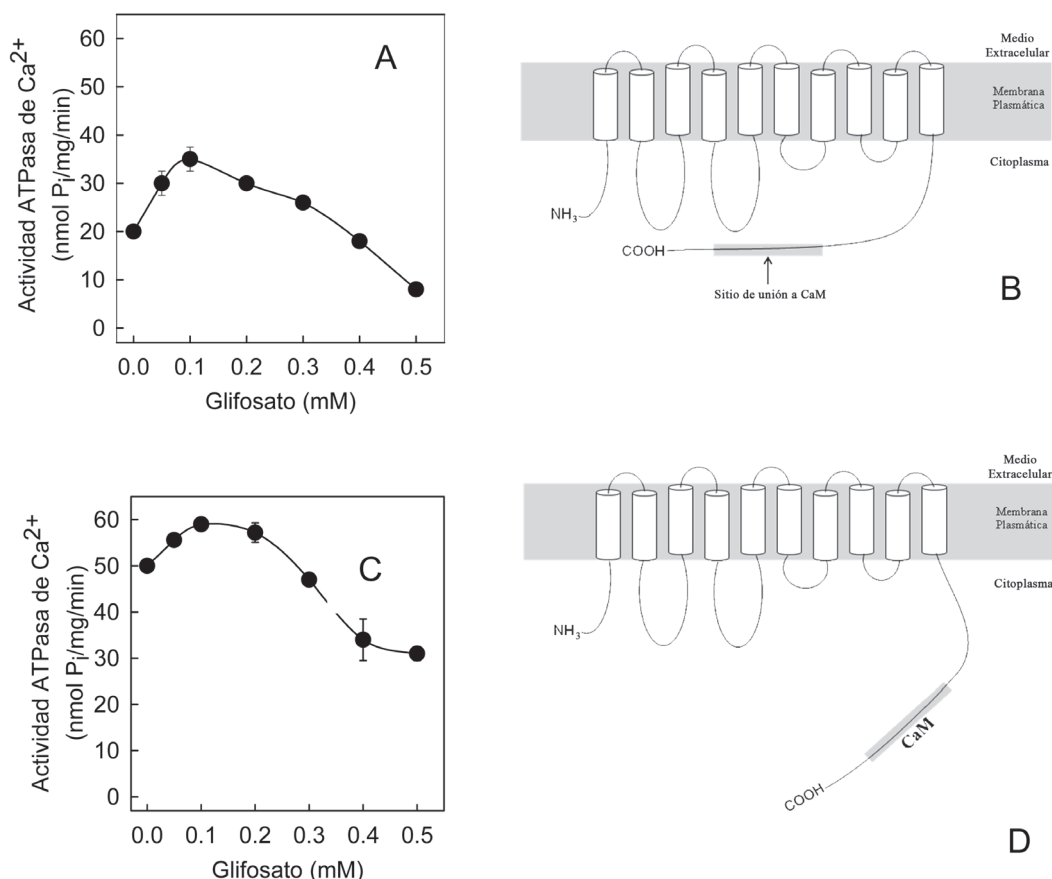
Determinación de Ca^{2+} libre en el medio. La concentración de 10 μM de Ca^{2+} libre en el medio proveniente de la adición de $CaCl_2$, y la cantidad apropiada de $CaCl_2$ fue determinada mediante el programa computacional *Cacium* (Fabiato and Fabiato, 1979). Este programa

computacional calcula el valor constante de estabilidad del complejo Ca^{2+} -EGTA (Schwartzbach *et al.*, 1957), el equilibrio de protonación del EGTA (Blinks *et al.*, 1982) y la presencia de otros ligandos como las concentraciones de ATP, Ca^{2+} y el pH del medio de reacción. De esta forma es posible realizar experimentos con una concentración constante de Ca^{2+} libre en el medio.

Resultados

El glifosato fue capaz de afectar al complejo CaM-PMCA, pero a menor escala que a la conformación nativa de la enzima. En este trabajo evaluamos el efecto del herbicida organofosfado GF sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} de membrana plasmática de eritrocito humano (PMCA, isoforma 4b), valorando colorimétricamente la aparición de P_i liberado por la hidrólisis de ATP durante el ciclo de reacción enzimático. Iniciamos los experimentos partiendo de la conformación nativa de la enzima (Figura 2B) o en su conformación activa por CaM (Figura 2D). La actividad enzimática de la Ca^{2+} -ATPasa se determinó en un medio de reacción que contenía: Mops 30 mM (pH 7.2), KCl 130 mM, $MgCl_2$ 3 mM, EGTA 0.5 mM, $CaCl_2$ 0.5 mM (Ca^{2+} libre 10 μM), 0.12 mg prot/ml y CaM cuando se indica (Figura 2). Cuando la actividad se mide en presencia de CaM usualmente se observa una estimulación con un incremento de 2.5 a 3 veces, que puede variar según la partida de extracción de membranas (~ 50 nmol P_i /min y mg de proteína, ver Figuras A y C). A continuación pasamos a estudiar el efecto de GF sobre la enzima PMCA de eritrocito. En presencia de GF 0.1 mM la actividad hidrolítica de la conformación nativa de PMCA fue estimulada en 62.5% sobre el control sin GF (Figura A), mientras que a concentraciones más elevadas de GF a partir de 0.4 mM, causó un perfil de inhibición de la actividad hidrolítica de PMCA progresiva y monofásica al aumentar la concentración del plaguicida (Figura 2A).

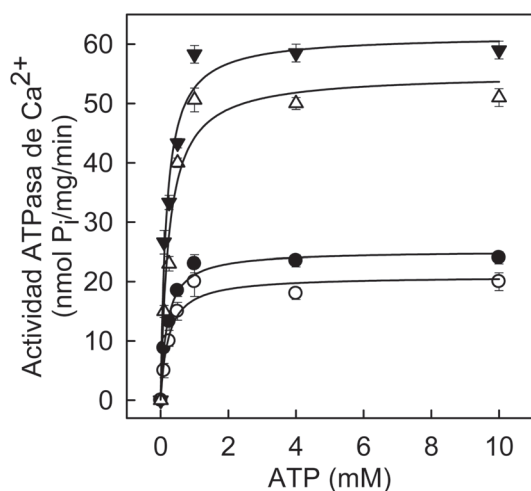
Figura 2. Curvas de dosis-respuesta donde se demuestra el efecto del glifosato sobre dos conformaciones enzimáticas de PMCA. La actividad hidrolítica de PMCA fue estudiada tanto en su forma conformacional nativa (sin CaM) (A y B) o en su forma conformacional CaM-PMCA (C). CaM induce un pronunciado cambio conformacional en PMCA (D) teniendo como principal característica un sitio catalítico más expuesto y por lo tanto, mayor actividad enzimática. Diferentes concentraciones de glifosato fueron tituladas en contra de la actividad hidrolítica de PMCA. Estos resultados dan evidencia de que el glifosato fue capaz de estimular en menor grado al complejo PMCA-CaM, lo que puede sugerir una menor sensibilidad al compuesto en presencia de CaM. Cada punto en la grafica representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes.



El perfil de estimulación-inhibición fue distinto cuando los experimentos se realizaron en presencia de CaM. En este caso, la actividad del complejo CaM-PMCA mostró cierta protección frente a la inhibición y solo hubo una estimulación promedio de la actividad enzimática del 20% con 0.1 mM de GF (Figura 2C). Es importante destacar el hecho de que a la forma nativa de PMCA, al igual que al complejo CaM-PMCA, fueron igualmente inhibidos a alrededor del 40% con GF 0.5 mM; esta concentración fue la más alta titulada en nuestros experimentos, evidenciando que el complejo CaM-PMCA fue menos sensible al efecto estimulador por GF.

El glifosato incrementó la hidrólisis de ATP, pero sin afectar la afinidad del ATP por la enzima en su conformación nativa. Para determinar el efecto de GF sobre la afinidad del enzima por ATP, estudiamos la actividad frente a la concentración del sustrato fosforilante en la forma nativa y en el complejo PMCA-CaM. Para los experimentos se utilizó una concentración fija de GF 0.05 mM. La actividad enzimática en presencia de CaM exógena aumenta al elevar la concentración de ATP, alcanzando un perfil de saturación, que se da cuando la enzima alcanza su velocidad máxima de reacción (Δ). La actividad de la enzima también

Figura 3. El glifosato significativamente incrementa el máximo nivel de hidrólisis de ATP por PMCA pero sin afectar la K_m . La actividad Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA fue estudiada a una concentración constante de 0.05 mM glifosato y titulando por separado varias concentraciones de ATP (0.001-10 mM). Estos valores de concentración se tabularon frente a la actividad enzimática. El efecto de glifosato fue estudiado en la conformación nativa de PMCA (●) o en el complejo PMCA-CaM (▼). Las figuras blancas muestran los experimentos control sin glifosato en ambas formas conformacionales: nativa (○) y PMCA-CaM (△). Los valores de cinética enzimática fueron computados mediante la ecuación de Michaelis-Menten y los resultados se muestran en el Cuadro 1. Cada punto en las gráficas representa la media \pm error estándar, $n=3$. * $p=0.035$ comparado a la actividad enzimática sin glifosato. El GF solo incrementó significativamente la velocidad de hidrólisis del ATP de la conformación nativa de PMCA.



muestra un perfil de saturación cuando se incluye una baja concentración de GF (0.05 mM) en el medio de reacción (▼). Perfiles similares de saturación se observan en la forma nativa de la enzima (círculos blancos y negros). Con estos resultados calculamos los valores de V_{max} y K_m (Cuadro 1). Interesantemente, el GF incrementó significativamente la velocidad máxima de hidrólisis del ATP (V_{max}) de 20.9 ± 1.5 a 24.6 ± 0.9 , pero solo para la conformación nativa de PMCA, no así para el complejo PMCA-CaM, aunque GF fue capaz de estimular la V_{max} de 55 ± 3 a 61 ± 2 , este incremento no fue significativo. Estos resultados se verificaron mediante una prueba t de Student ($\alpha=0.05$) y el valor p se muestra en el correspondiente pie de figura. Cabe resaltar que no encontramos evidencia estadística de que hubiera diferencias

significativas entre los valores de K_m en los experimentos realizados con GF y sin GF en PMCA, tanto en su conformación nativa o para el complejo PMCA-CaM, lo que demuestra que GF no afecta la afinidad del ATP por PMCA. Nuestros resultados demuestran que GF solo incrementa la velocidad de hidrólisis del ATP por PMCA en su conformación nativa bajo las condiciones antes descritas.

Discusión

Recientemente describimos que el GF puede afectar la actividad hidrolítica de PMCA, sin embargo, quedó la interrogante sobre su mecanismo de acción sobre la enzima (Vargas-Medrano *et al.*, 2011). Un mecanismo de regulación sobre PMCA ampliamente estudiado, es el efecto estimulador ocasionado por la unión a calmodulina (CaM), el cual sucede cuando CaM se une al extremo carboxilo de PMCA (Carafoli, 1991), lo cual desenmascara el sitio de unión al ATP, propiciando una mayor eficiencia de transporte de Ca^{2+} por la bomba de Ca^{2+} (Figura 2D). Por ello, nuestro objetivo en este trabajo fue contribuir al conocimiento del mecanismo por el cual GF afecta la actividad de PMCA estudiando dos formas conformacionales típicas de la enzima: en su forma nativa (sin CaM) o en el complejo activo CaM-PMCA. Se han reportado muchos efectores asociados a CaM que son estimuladores de la actividad hidrolítica así como del transporte de Ca^{2+} (Benaim *et al.*, 1994). Muchos de ellos, sin embargo, solo proporcionan datos sobre el incremento de la afinidad de la enzima por Ca^{2+} y/o incrementan su máxima velocidad en la misma medida obtenida en presencia de CaM (Rega and Garrahan, 1986; Carafoli, 1991). En el presente trabajo demostramos que el GF estimuló la actividad ATPasa de Ca^{2+} nativa logrando un valor aproximado al obtenido en presencia de CaM, por lo menos del 40-60% si se compara con el control en presencia de CaM (Figuras 2A y 2C). Mediante la titulación de múltiples concentraciones de GF (0.05-0.5 mM) observamos un efecto de dosis-respuesta. Esto

significa que las diferentes medidas ensayadas con GF, produjeron un efecto de estimulación e inhibición sobre la actividad hidrolítica de PMCA en ausencia del activador biológico CaM (Figs. 2A y 2B), las concentraciones de 0.05 a 0.1 mM de GF estimularon la hidrólisis del ATP, mientras que las concentraciones más elevadas del GF (0.4-0.5 mM) causaron una inhibición progresiva sobre la hidrólisis del ATP. Se ha demostrado que la presencia de moléculas orgánicas que provocan estimulación de la actividad en PMCA, intervienen con el C-terminal de la enzima y/o por la interacción con los fosfolípidos de la membrana y la región hidrófoba de la proteína, lo cual se confirma con los estudios realizados sobre el efecto del etanol que promueve la estimulación de la actividad PMCA de eritrocito humano de forma similar que la activada por CaM (Benaim *et al.*, 1994), donde el aumento en el grado de activación fue asociado a la afinidad de la enzima por Ca^{2+} y ATP que provocaron el aumento de la V_{max} . Aunque ellos concluyen que este incremento fue debido a que el etanol como solvente orgánico posiblemente interfiera con el calcio disuelto. En principio discuten que la presencia del orgánico podría afectar la estructura de la enzima pero también la aparente afinidad de la enzima por sus ligandos y al sistema de amortiguamiento del Ca^{2+} , así como cambios locales en el ambiente lipídico que afecta la fluidez de la membrana. En otro trabajo realizado por Benaim y de Meis (1989) sobre el efecto de solventes orgánicos como dimetilsulfóxido, glicerol, etilenglicol y polietilenglicol sobre la PMCA de eritrocito humano, observaron que estos simulan los efectos de activación por CaM o por fosfolípidos ácidos, llegando a la conclusión de que incrementan la afinidad por Ca^{2+} y el número de ciclos catalíticos de la enzima. Estos efectos fueron promovidos por interacciones hidrofóbicas a lo largo de la molécula de enzima. Los efectos de solventes orgánicos sobre la PMCA de membrana de eritrocito difieren de los descritos en la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico (SERCA), ya que la afinidad por Ca^{2+} no se modifica (Benaim and de Meis, 1989).

Diversos trabajos realizados en SERCA sobre el fenómeno de activación causado por diversas moléculas orgánicas como el TCS (3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide) (Wakabayashi *et al.*, 1988), observaron un aumento en la velocidad del ciclo catalítico por la isomerización del estado conformacional E_1PCa_2 hacia el estado E_2PCa_2 propiciando un aumento del transporte de Ca^{2+} .

En los experimentos control que realizamos en presencia de CaM, la estimulación de la actividad hidrolítica de PMCA fue de ~150% sobre el control sin CaM (Figura 2C). De acuerdo con la literatura, CaM se une a PMCA con una estequiometría de unión de 1:1, ello produce en la enzima mayor afinidad por el Ca^{2+} lo que incrementa la V_{max} en la hidrólisis del ATP (Hinds and Andreasen, 1981). CaM induce cambios en la K_d aparente del Ca^{2+} de 30 μ M a 1 μ M, lo que permite un incremento en el transporte de Ca^{2+} (Carafoli, 1991). En nuestros experimentos, obtuvimos un doble incremento sobre la velocidad de hidrólisis del ATP (V_{max} de 20.9 ± 1.5 sin CaM a 61 ± 2 con CaM).

Sorpresivamente, cuando titulamos varias concentraciones de GF (0.05-0.5 mM) el efecto estimulador de GF sobre el complejo activo CaM-PMCA fue menor que el producido sobre la conformación nativa de la enzima, ello respecto a su control que no contenía GF (Figura 2C). Sin embargo, concentraciones de 0.25-0.5 mM también inhibieron parcialmente la actividad enzimática de PMCA. Ello por una parte nos puede reafirmar lo dicho con anterioridad, donde GF esté actuando como un activador similar a CaM, de ahí que el bajo aumento causado en el complejo CaM-PMCA por GF nos sugiere que la enzima se encuentra saturada, es decir ha alcanzado un valor cercano a su V_{max} y no se puede extender considerablemente como en la ausencia de CaM. Por otro lado, el trabajo de Benaim y de Meis (1989) nos muestra en un sistema similar de PMCA de eritrocito pero en presencia de dimetilsulfóxido en el medio, donde este minimizó la activación por CaM, lo cual podría ser nuestro caso sobre el complejo

CaM-PMCA en presencia de GF, es decir, que GF esté causando un efecto similar al de dimetilsulfóxido en presencia de CaM.

Después de haber analizado detenidamente el efecto de GF sobre la hidrólisis de ATP mediada por PMCA, proseguimos a analizar el efecto del GF sobre la afinidad del sustrato de PMCA. Cabe mencionar que el ATP es el sustrato fosforilante de PMCA y es la fuente química de energía de esta enzima para realizar su función de transporte de Ca^{2+} . Para ello titulamos diferentes concentraciones del sustrato sobre la actividad hidrolítica de PMCA, a una concentración constante de GF en el medio de reacción (Figura 3, ▼ ●). Posteriormente, implementamos la ecuación de Michaelis-Menten y calculamos los valores de V_{max} y K_m . Los resultados de este cómputo se presentan resumidos en el Cuadro 1 para fines comparativos.

Cuadro 1. Valores de cinética enzimática en ausencia y presencia de glifosato.

Tratamiento	V_{max} (nmol P_i /mg/min)	K_m (mM)
PMCA	20.9 ± 1.5	0.20 ± 0.07
PMCA + GF	24.6 ± 0.9*	0.17 ± 0.03
PMCA-CaM	55 ± 3	0.20 ± 0.05
PMCA-CaM + GF	61 ± 2	0.10 ± 0.03

Como ya comentamos anteriormente, CaM provoca un incremento de la V_{max} de PMCA (Hinds and Andreasen, 1981) y en consecuencia, el aumento del ciclo catalítico de la PMCA de membrana de eritrocito que involucra un estado de reacciones parciales, que incluyen un proceso de alta afinidad por Ca^{2+} situado de la superficie extramembranal (E_1), que promueve la unión e hidrólisis de ATP y lleva a un proceso de fosforilación denominado transición conformacional de fosfoproteína de alta energía (E_1CaP) y su posterior descenso de afinidad por Ca^{2+} creando un estado de más baja energía (E_2CaP) que promueve el

transporte del ion y un proceso de desfosforilación (E_2P) (Allen *et al.*, 1987; Carafoli, 1991, Herscher and Rega, 1996). Podríamos pensar que GF favorece la aceleración de un estado conformacional de alta energía a uno de menor energía E_2CaP , que explique el proceso de activación, mas en PMCA no sucede así, este tipo de aceleración conformacional de alta a baja energía se da comúnmente en la activación causada por solventes en la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico (Wakabayashi *et al.*, 1988). En nuestro caso, normalmente el complejo CaM-PMCA produjo mayor hidrólisis de ATP que la forma nativa de PMCA (sin CaM), sin embargo, la afinidad del ATP fue la misma para ambas formas conformacionales en presencia de GF respecto a los controles sin el químico, al no haber diferencias significativas entre dichos valores (Cuadro 1).

Se ha reportado que PMCA en presencia de Mg^{2+} tiene un K_m de baja afinidad de 145 y 180 μ M dependiendo del grupo de investigación que lo reporte (Richards *et al.*, 1978; Mualem and Karlsh, 1979). En nuestros experimentos obtuvimos valores de K_m de 0.20 ± 0.07 mM y 0.2 ± 0.05 mM para PMCA y CaM-PMCA respectivamente; dichos valores muy cercanos al valor previamente reportado de 180 μ M (Mualem and Karlsh, 1979). Sin embargo, fue sorprendente observar que el GF incrementara significativamente los valores de la V_{max} solo para la conformación nativa de PMCA. Lo anterior, valida nuestros experimentos en los que la unión de CaM a PMCA, no modifica la afinidad (K_m) pero sí la velocidad del ciclo catalítico, reflejado en un incremento en la V_{max} . Ello podría ser porque CaM se encuentra ocupando mismo mecanismo por el cual GF estimula a PMCA, aunque no necesariamente tiene que ser el mismo sitio de unión. Así que cuando GF es añadido a la reacción enzimática, GF no estimuló, ya que esta vía estimuladora estaba siendo utilizada por CaM. Este mismo fenómeno no sucede en PMCA sin CaM, donde GF puede estimular la V_{max} significativamente.

Respecto del efecto dual de activación e inhibición, Jones y Lee (1986) proponen un modelo en donde las moléculas con cierta tendencia hidrofóbica que inducen un efecto dual (estimulan e inhiben) es debido a que interactúan o se unen en sitios no anulares en la proteína de membrana (interacciones proteína-proteína). De esta forma se puede asumir que lo mismo pudiera pasar con la actividad enzimática de PMCA. Por otro lado, el proceso de inhibición se puede deber a la unión de los compuestos, tales como el GF, a sitios anulares en la proteína de membrana (lípidoproteína). Sin embargo, y desde nuestro conocimiento, no se habían encontrado estudios de este efecto dual causado por GF en la actividad de PMCA de eritrocito humano. Otra posibilidad del efecto estimulador de PMCA por GF puede ser a través de la modulación de las interacciones entre monómeros de PMCA, lo cual evidencian la estimulación de la actividad enzimática mediante un proceso de oligomerización (Kosk-Kosicka and Bzdega, 1988).

La literatura indica que los estudios llevados a cabo sobre el efecto y las implicaciones del GF en el hombre y animales son insuficientes (Williams *et al.*, 2012), incluyendo químicamente al GF libre de surfactantes y demás componentes de la fórmula, lo cual es discutido en términos del contenido que acompaña al plaguicida es la fracción potencialmente tóxica (Bradberry *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2012). Es por ello que en nuestro trabajo utilizamos GF de grado analítico de estándar, con el fin de eliminar posibles disturbios ocasionados por los aditivos que suelen contener las fórmulas comerciales. Estudios llevados a cabo con GF evidencian que puede ser tóxico para humanos debido a que afecta la funcionalidad de diferentes enzimas cruciales para el metabolismo de la célula, como la inhibición de sus actividades enzimáticas, de manera que es tóxico para las células (Peixoto, 2005). Debido a esta evidencia, asumimos que la inhibición de la actividad

enzimática en PMCA por GF puede ser tóxico para la célula y los tejidos, ya que PMCA es una de las principales proteínas reguladoras de Ca^{2+} en eritrocitos y la única enzima que regula concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} acoplado la hidrólisis de ATP para la translocación y salida del ion de la célula. Realizamos este estudio con CaM, debido a que es el principal activador bioquímico de PMCA en este sistema, y que además es una proteína de gran interés fisiológico para las células, simultáneamente las dos proteínas co-participan regulando niveles elevados de Ca^{2+} intracelular (Carafoli, 1991). CaM se activa por Ca^{2+} , y a su vez responde activando múltiples vías metabólicas dentro de la célula, incluyendo vías de fosforilación a través de quinasas dependientes de CaM (Shenolikar *et al.*, 1979) o en nuestro caso, estimulando la actividad enzimática de PMCA para mantener la homeostasis del Ca^{2+} en esta célula del eritrocito humano (Pérez-Gordones *et al.*, 2009) que es de suma importancia.

Conclusión

En conclusión, GF incrementó la velocidad máxima de la hidrólisis del ATP (V_{max}) de forma significativa, en PMCA en su forma nativa (sin unión a CaM). Sin embargo, GF no afectó significativamente al complejo CaM-PMCA. Proponemos que GF podría estimular a PMCA incrementando la velocidad el ciclo catalítico de PMCA, en una manera similar a la propuesta por la unión a CaM (Carafoli, 1991). Para ello, se requiere estudiar el ciclo catalítico de PMCA en presencia de GF y analizar si hay un efecto sobre la velocidad en las etapas de fosforilación y descomposición dentro del ciclo catalítico de PMCA. Además, sería interesante estudiar si el efecto de GF incide en alguna forma sobre la afinidad y transporte de Ca^{2+} en PMCA unida a CaM o sin CaM. Ya que si GF pudiera estar imitando el efecto de CaM en PMCA, sin duda, podría estar afectando la afinidad por el Ca^{2+} y el transporte, pudiendo ocasionar disturbios en la homeostasis celular del Ca^{2+} .

Agradecimientos

Agradecemos a los fondos otorgados por el CONACYT-Gobierno del estado de Chihuahua, México, proyecto de investigación CHIH-2006-C01-57268. Agradecemos también las valiosas sugerencias de los revisores de nuestro trabajo de investigación.

Literatura citada

- ALLEN, B. G., S. Katz, and B. D. Roufogalis. 1987. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} and calmodulina on the formation and decomposition of the phosphorylated intermediate of the erythrocyte Ca^{2+} -stimulated ATPase. *Biochem. J.* 244:617-623.
- ANTUNES-MADEIRA, M. C., and V.M. Madeira. 1990. Membrane fluidity as affected by the organochlorine insecticide DDT. *Biochim. Biophys. Acta* 1023(3):469-74.
- BAYKOV, A.A., O.A. Evtushenko, and S.M. Avaeva S.M. 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical Biochemistry* 171(2):266-270.
- BAYLIS, A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest. Manag. Sci.* 56:299-308.
- BENAIM, G., and L. de Meis. 1989. Activation of the purified erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by organic solvents. *FEBS Lett.* 244(2):484-486.
- BENAIM, G., V. Cervino, C. Lopez-Estraño, and C. Weitzman. 1994. Ethanol stimulates the plasma calcium pump from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1195:141-148.
- BENAIM, G., M. Zurini, and E. Carafoli. 1984. Different conformational states of the purified Ca^{2+} -ATPase of the erythrocyte plasma membrane revealed by controlled trypsin proteolysis. *J. Biol. Chem.* 259(13): 8471-8477.
- BLASIAK, J. 1995. Inhibition of erythrocyte membrane ($Ca^{2+} + Mg^{2+}$)-ATPase by the organophosphorus insecticides parathion and methylparathion. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 110(2):119-125.
- BLINKS, J.R., W.G. Wier, P. Hess, and Prendergast F.G. 1982. Measurement of Ca^{2+} concentrations in living cells. *Prog. Biophys. and Mol. Biol.* 40(1-2):1-114.
- BOLOGNESI, C., S. Bonatti, P. Degan, E. Gallerani, M. Peluso, R. Rabboni, P. Roggieri, and A. Abbondandolo. 1997. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.* 45(5):1957-1962.
- BRADBERRY, S. M., M. Sally, A. T. Proud, and V. J. Allister. 2004. Glyphosate poisoning. *Toxicol. Rev.* 23:159-167.
- CARAFOLI, E. 1991. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 71(1):129-53.
- CASTILLO-SOSA, Y., A. Sierra-Fonseca, A. Martínez-Martínez, and F. Plenge-Tellechea. 2009. Efecto del diazinón sobre el cultivo de linfocitos de sangre periférica de humano. *Tecnociencia Chihuahua.* 3(2):97-106.
- DALVIE, M.A., E. Cairncross, A. Solomon, and L. London. 2003. Contamination of rural surface and ground water by endosulfan in farming areas of the Western Cape, South Africa. *Environ. Health* 2(1):1-15.
- DIKSHITH, T.S., J.R. Behari, K.K. Datta, and A.K. Mathur. 1975. Effect of diazinon in male rats. Histopathological and biochemical studies. *Environ. Physiol. Biochem.* 5(5):293-299.
- EL-DEMERDASH, F.M., M.I. Yousef, and I. E.I. Elagamy. 2001. Influence of Paraquat, Glyphosate, and Cadmium on the Activity of Some Serum Enzymes and Protein Electrophoretic Behavior (In Vitro). *J. Environ. Sci. Health B.* 36(1):29-42.
- FABIATO, A., and F. Fabiato. 1979. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol* 75(5):463-505.
- GARRY, V., T. Danzl, R. Tarone, J. Griffith, J. Cervenka, L. Krueger, J. Whorton, and R.L. Nelson. 1992. Chromosome rearrangements in fumigant applicators: possible relationship to non-Hodgkin's lymphoma risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1(4):287-91.
- GARRY, V.F., J. Griffith, T.J. Danzl, R.L. Nelson, E.B. Whorton, L.A. Krueger, and J. Cervenka. 1989. Human genotoxicity: pesticide applicators and phosphine. *Science* 246(4927):251-255.
- HERSCHER, C. J., and A. F. Rega. 1996. Pre-State kinetic study of the mechanism of inhibition of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by lanthanum. *Biochem.* 35(47): 14917-14922.
- HINDS, T.R., and T.J. Andreassen. 1981. Photochemical cross-linking of azidocalmodulin to the ($Ca^{2+} + Mg^{2+}$)-ATPase of the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 256(15): 7877-7882.
- JONES, O., and A. Lee. 1986. Effect of pyrethroids on the activity of a purified (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 25:420-430.
- KIELY, T., D. Donaldson, and A. Grobe. 2004. Pesticide industry sales and usage, 2000 and 2001 market estimates: U.S. Environmental Protection Agency.
- KOSK-KOSICKA, D., and T. Bzdega. 1988. Activation of erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. *J. Biol. Chem.* 263:18184-18189.
- LANZETTA, P., L. Álvarez, P. Reinach, and O. Candia. 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 100(1):95-7.
- LIOI, M., M. Scarfi, A. Santoro, R. Barbieri, O. Zeni, F. Salvemini, D. Di Bernardino, and M. Ursini. 1998a. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. *Environ. Mol. Mutagen.* 32(1):39-46.
- LIOI, M., M. Scarfi, A. Santoro, R. Barbieri, O. Zeni, D. Di Bernardino, and M. Ursini. 1998b. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocytes cultures in vitro. *Mutat. Res.* 403(1-2):13-20.
- LOWRY, O.H, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):265-275.
- LYNCH, T.J., and W.Y. Cheung. 1979. Human erythrocyte (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase: mechanism of stimulation by Ca^{2+} . *Arch. Biochem. Biophys.* 194(1): 165-170.
- MARINOVICH, M., M. Guizzetti, and C.L. Galli. 1994. Mixtures of benomyl, pirimiphos-methyl, dimethoate, diazinon and azinphos-methyl affect protein synthesis in HL-60 cells differently. *Toxicology* 94(1-3):173-185.
- MODY, I., and J.F. MacDonald. 1995. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: The role of intracellular Ca^{2+} release. *Trends in Pharmacological Sciences* 16(10):356-359.
- MUALEM, S., and S.J. Karlish. 1979. Is the red cell calcium pump regulated by ATP? *Nature* 277(5693):238-240.
- NICOTERA, P., H. Thor, and S. Orrenius. 1989. Cytosolic-free Ca^{2+} and cell killing in hepatoma 1c1c7 cells exposed to chemical anoxia. *FASEB* 3(1):59-64.
- NIGGLI, V., J.T. Penniston, and E. Carafoli. 1979a. Purification of the (Ca^{2+} - Mg^{2+}) ATPase from Human Erythrocyte Membranes using a Calmodulin Affinity Column. *J. Biol. Chem.* 254(20):9955-9958.
- NIGGLI, V., E.S. Adunyah, B.F. Cameron, E.A. Bababunmi, and E. Carafoli. 1982. The Ca^{2+} - pump of sickle cell plasma membranes. Purification and reconstitution of the ATPase enzyme. *Cell Calcium* 3(2):131-151.
- OKUNADE, G. W., M.L. Miller, G.J. Pyne, R.L. Sutliff, K.T. O'Connor, J.C. Neumann, A. Andringa, D.A. Miller, V. Prasad, T. Doetschman, R.J. Paul, and G.E. Shull. 2004. Targeted ablation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J. Biol. Chem.* 279(32):33742-33750.

- PEIXOTO, F. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61(8):1115-1122.
- PELUSO, M., A. Munnia, C. Bolognesi, and S. Parodi. 1998. 32P-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environ. Mol. Mutagen.* 31(1):55-9.
- PENNISTON, J.T. A.G. Filoteo, C.S. McDonough, and E. Carafoli 1988. Purification Reconstitution and Regulation of Plasma Membrane Ca^{2+} Pumps. *Methods in Enzymology* 157:340-351.
- PÉREZ-GORDONES, M. C., M. R. Lugo, M. Winkler, V. Cervino, and G. Benaim. (2009). Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocyte by direct interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 489:55-61.
- PLENGE-TELLECHEA, L.F., and J. Vargas-Medrano, J. (2003). Efecto tóxico de los plaguicidas agrícolas sobre la relajación muscular. Estudio de la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA). *Ciencia en la Frontera* 1(1):75-79.
- REGA, A. F., and P. J. Garrahan. 1986. In the Ca^{2+} pump of plasma membranes (Rega, A. F. and Garrahan, P. J., eds.), *CRC Press*, Boca Raton.
- RICHARDS, D.E., A.F. Rega, and P.J. Garrahan. 1978. Two classes of site for ATP in the Ca^{2+} -ATPase from human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 511(2):194-201.
- ROUFOGALIS, B. D. 1979. Regulation of calcium translocation across the red blood cell membrane. *Can. J. Ohysiol. Pharmacol.* 57(12):1331-1349.
- SCHWARTZENBACH, G., H. Senn, and G. Anderegg. 1957. Komplexe. XXIX. Ein grosser Celateffekt besonderer. *Helv. Chim. Acta* 40:1886-1900.
- SHENOLIKAR, S., T. W. Cohen, P. Cohen, A. C. Nairn, and V. Perry. 1979. The role of calmodulin in the structure and regulation of phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 100(2):329-337.
- VARGAS-MEDRANO, J., J. A. Sierra-Fonseca, M. Arellano-Carrillo, and F. Plenge-Tellechea. 2011. Cypermethrin, deltamethrin and glyphosate affect the activity of the Ca^{2+} -ATPase from human erythrocyte. *Tecnociencia Chihuahua* 5(3):121-131.
- WAKABAYASHI, S., T. Ogurusu, and M. Shigekawa. 1988. Mechanism for 3,3',4',5'-Tetrachlorosalicylanilide-induced activation of sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 263.15304-15312.
- WILLIAMS, G.M., R. Kroes, and I.C. Munro. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31:117-165.
- WILLIAMS, A. L., R. E. Watson, and J. M. DeSesso. 2012. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B: Crit. Rev.* 15(1):39-96.

Este artículo es citado así:

Arellano-Carrillo, M., J. Vargas-Medrano, J. A. Sierra-Fonseca y F. Plenge-Tellechea. 2012: *El plaguicida glifosato incrementa la V_{max} de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de eritrocito humano sin afectar su afinidad (K_m) por el sustrato.* *TECNOCENCIA Chihuahua* 6(2): 101-111.

Resúmenes curriculares de autor y coautores

MANUEL DAVID ARELLANO CARRILLO. En el año 2009 obtuvo el grado de Licenciado en Biología en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez con el tema de tesis: Interacción de plaguicidas sobre la actividad enzimática de la ATPasa de Ca^{2+} de eritrocito humano (PMCA). Además, el biólogo ha participado en diversos congresos nacionales e internacionales entre los que destacan varios congresos nacionales de bioquímica y uno organizado por la American Chemical Society. Los trabajos de investigación donde ha colaborado se han publicado en diversas revistas tales como en la revista *Ciencia en la Frontera*. Actualmente, el biólogo culminó sus estudios en la Maestría con Orientación Genómica en la UACJ donde evaluó el efecto de deltametrina sobre la expresión de diversos genes en Linfocitos T humanos e imparte la cátedra de Bioquímica en la citada Universidad.

JAVIER VARGAS MEDRANO. El oriundo de Ciudad Juárez, ingresó al programa de Biología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez en 1999 como parte de la primera generación del nascente programa. Ahí estudió el efecto de diferentes estructuras químicas de diclorobenzenos (precursores de pesticidas) sobre ATPasas de Ca^{2+} . Después de obtener el grado de Licenciado, emigró a la Universidad de Texas en El Paso donde comenzó su Disertación Doctoral estudiando la fosforilación del transportador de glicina de cerebro, lo cual en la clínica puede ser un prometedor tratamiento para Esquizofrenia. Durante su estudio doctoral fue distinguido dos veces como asistente de investigación con fondos del National Institute of Health and National Institute of Mental Health de los Estados Unidos. En el 2011, fue distinguido con el Hispanic Training Fellowship para ocupar la posición de Postdoctoral-Research Associate en el Texas Tech Health Science Center en El Paso, Texas. Actualmente, el doctor es miembro de la American Chemical Society y se encuentra inmerso en varias investigaciones sobre una de las proteínas (CCR5) responsables de la entrada del virus del SIDA a las células, proyecto financiado por el National Institute of Health.

JORGE ANIBAL SIERRA FONSECA. Se graduó del programa de Licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ) en el año 2007. Posteriormente inició sus estudios de posgrado en la Universidad de Texas en El Paso (Texas, EUA), donde fue admitido en el programa de doctorado en Ciencias Biológicas/Patobiología. Actualmente cursa su tercer año en el programa de doctorado, donde además de desarrollar su proyecto de investigación, también funge como instructor asistente en diversos cursos de licenciatura. Ha asistido a diversos congresos locales, regionales, nacionales e internacionales, donde ha presentado los resultados de diversos proyectos de investigación. Actualmente se encuentra estudiando el papel de las proteínas G heterotrimericas en la organización del citoesqueleto durante la diferenciación neuronal y neurodegeneración, utilizando diversos modelos celulares. Sus intereses incluyen biología celular, neurociencias, señalización celular y cáncer.

LUIS FERNANDO PLENGE TELLECHEA. Desde 1990 ingresó como becario interno del laboratorio de reproducción en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California. En 1992 culminó sus estudios de Biología en la misma dependencia. Posteriormente realizó sus estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Murcia, culminando en 1998. El Dr. Plenge se ha caracterizado por sus estudios bioquímicos en la rama de proteínas asociadas en membranas. Actualmente labora como profesor investigador de tiempo completo en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cuenta con múltiples publicaciones y dirección de tesis de pregrado y de grado. Es actual director en jefe de la revista de ciencias, *Ciencia en la Frontera*, e imparte la cátedra de Bioquímica en el programa de Biología y de Estructura y función proteínas en la Maestría en Ciencias con orientación en genómica (PNP). El Dr. Plenge terminó en el 2011 una estancia Posdoctoral en el Border Biomedical Research de la Universidad de Texas at El Paso, en la que estudió los mecanismos bioquímicos de neurotransportadores.