



BEB 85

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

VOLUMEN IV

NUM. 2

JUNIO 1985

EDITORIAL

BIOQUIMICA Y SOCIEDAD

Con este editorial se inicia una sección en el BEB la cual aspira a ofrecer a la comunidad de estudiosos de la bioquímica —profesores, alumnos, investigadores— algún aspecto que relacione a la bioquímica con el servicio que le preste, o potencialmente le pueda proporcionar, a la sociedad, a la comunidad quien en última instancia financia su existencia y con la que, en teoría al menos, habrá de estar estrechamente ligada. Desde luego no se refiere a la Sociedad Mexicana de Bioquímica, con la cual el BEB mantiene amistosas relaciones y a la que se harán frecuentes referencias. Se refiere a la sociedad en una acepción más amplia. Además se refiere a cualquier tipo de servicio o beneficio, directo o indirecto, que la bioquímica le ofrezca a la dicha sociedad.

No se trata de urgir en el aspecto utilitarista de la bioquímica (o de la ciencia en general), sino de darle una dimensión social, real, y de empezar a manejar parámetros económicos y sociales en función de la bioquímica y en periodos de marcada recesión económica, no sólo en México, sino en general, en toda Latinoamérica.

Dadas las características de la sección que hoy se estrena, será improbable el establecimiento de criterios uniformes. Invitamos, una vez más, a los estudiosos de la bioquímica, para que en esta sección participen con su opinión, buscando y proponiendo novedosas opciones para que la bioquímica sirva a la sociedad y para que la sociedad vea en la bioquímica una inversión redituable. Sin lugar a dudas, la pluralidad de pensamientos permitirá la optimización de las acciones que valga la pena desarrollar.

No olvidemos que cada profesor al diseñar, planear y llevar a cabo cada uno de sus cursos de bioquímica, constituye una pequeña parte del todo de la enseñanza de esta materia en una universidad, en un estado y en un país. Por ende, cada profesor interviene en la planeación de la enseñanza y la situación futura de la bioquímica en el país. Incluso, si lo hacemos bien dentro de la bioquímica, seremos un punto de comparación y un acicate para otras áreas, cuando menos, de las ciencias biológicas. Nadie más, aparte de los profesores, serán los responsables de lo que es y será la bioquímica en la sociedad. Como profesores cumplamos con este desdibujado pero insoslayable compromiso.

Como investigadores, nuestro compromiso social no es menos apremiante. Son varias las facetas en las que puede manifestarse un servicio del investigador hacia la sociedad; sin embargo, en muchas ocasiones lo anterior pasa inadvertido para el propio investigador. E insisto, no se trata únicamente del investigador dedicado a la investigación tecnológica de aplicación inmediata, sino de forma especial, al investigador dedicado a los aspectos más complejos y teóricos de la investigación, carentes de aplicación. Es importante que los investigadores hagamos conciencia de que el producto de nuestro trabajo es un servicio que le hacemos a la sociedad. La calidad del servicio estará en función de la calidad de nuestro producto de trabajo. Al ser mejores investigadores seremos mejores servidores de la sociedad a la cual pertenecemos.

Esperamos opiniones y puntos de vista que ojalá acrecienten las relaciones bioquímica-sociedad.

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM.

COMITE EDITORIAL

GUILLERMO ALVAREZ LLERA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

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

GUILLERMO CARVAJAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional

ALBERTO HAMABATA
Centro de Investigación y Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

JOSE ANTONIO HOLGUIN HUESO
Instituto Nacional de Cardiología
"Dr. Ignacio Chávez"

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

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

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

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

CORRESPONSALES
Serafín Aguado (Morelia, Mich.), Ma. Dolores Alvarez Bruneliere (León, Gto.), Humberto Avila Rodríguez (Durango, Dgo.), Alberto Boveris (Buenos Aires, Argentina), Carlos Corredor (Cali, Colombia), Alfredo Delgado (Monterrey, N.L.), Manuel Escobar L. (Zacatecas, Zac), Jesús R. Garcilaso (Hermosillo, Son.), Ma. Cristina González de Mac Swiney, (Mérida, Yuc.), Ma. Guadalupe Oliva Ruiz (Tampico, Tamps.), Ma. Guadalupe Puga (Querétaro, Qro.), Héctor Reyes Leal (Ciudad Juárez, Chih.), José Alberto Rivera Brechu (México, D.F.), Jesús M. Rodríguez (San Luis Potosí, S.L.P.), Alba Marina Valdez de García (Guatemala, Guatemala, C.A.), Manuel Vázquez T. (Santo Domingo, República Dominicana).



FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.

DR. FERNANDO CANO VALLE
Director

DR. ULISES AGUILAR BATURONI
Secretario General

C.P. EDUARDO MUÑOZ GONZALEZ
Secretario Administrativo

INDICE

BEB 85 Vol. IV, Núm. 2 de junio 1985

EDITORIAL

Bioquímica y Sociedad. Enrique Piña Garza.....33

ARTICULOS

Citotoxicidad de xenobioticos. Un problema metabólico. Luis A. Videla.....35

Los mecanismos para evaluar la evolución a nivel bioquímico. Raúl Arredondo Peter.....40

Extracción de RNA de tejidos vegetales. Comparación de tres métodos. Irma Bernal Lugo, Ma. del Carmen Parra González y Marina Gavilanes.....46

Hacia los cambios trascendentales en la educación Bioquímica. Silvia López Flores.....49

Fundamentos de la cromatografía líquida de alta presión y sus aplicaciones en biomedicina. Antonio Liras Martín.....52

OTRAS COMUNICACIONES

La caquexina. Guillermo Carvajal S.58

Se creo el Instituto de Fisiología Celular, Juan C. Díaz Zagoya.....59

Convocatoria.....60

De nuestros lectores. Jesús M. León Cazares.....61

INDICES DE REVISTAS.....61

Instrucciones para los colaboradores del Boletín de Educación Bioquímica.....64



CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA,

DR. HECTOR MAYAGOITIA DOMINGUEZ
Director General

DR. GONZALO HALFFTER
Director Adjunto de Desarrollo Científico

DONATIVO PCSACNA-430640

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB) es una publicación trimestral editada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Registro en Trámite. Correspondencia: Y. Saldaña de Delgadillo. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina UNAM. Apdo. Postal 70159. Delegación Coyoacán. 04510 México, D.F.

CITOTOXICIDAD DE XENOBIOTICOS: UN PROBLEMA METABOLICO

Luis A. Videla, Unidad de Bioquímica, Departamento de Ciencias Biológicas, División de Ciencias Médicas Occidente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 10455 - Correo Central, Santiago, Chile.

El hígado es el principal sitio de metabolización de compuestos extraños al organismo, es decir de xenobióticos, los cuales son transformados en metabolitos por enzimas del retículo endoplásmico liso de los hepatocitos (Fig. 1A). Generalmente, estos metabolitos son más hidrosolubles y menos activos que los compuestos de origen, factores que determinan en gran medida el término de la acción biológica de la droga y su eliminación del organismo. Sin embargo, en algunos casos las drogas son transformadas en agentes alquilantes, arilantes o en radicales libres (intermediarios radicalarios). Estos metabolitos activados pueden producir serias lesiones en la célula, que incluyen necrosis hepática, renal y pulmonar, aplasia de la médula ósea o neoplasias. A pesar de que las drogas de este tipo se usan en dosis terapéuticas en que no inducen toxicidad alguna, en casos de sobredosis, ingestión conjunta con otros fármacos o en presencia de estados tales como ayuno, desnutrición, alcoholismo, hipertiroidismo u otros, la posibilidad de ocurrencia de tales reacciones adversas se amplifica. En el humano la citotoxicidad de los fármacos que sufren activación metabólica se ha evidenciado en el caso de la isoniazida (agente tuberculostático) e iproniazida (antidepresivo) que inducen necrosis hepática. La ingesta de altas dosis de acetaminofeno y fenacetina (analgésicos) está asociada al daño hepático y renal; existe toxicidad renal luego de la administración de furesemida (diurético) y de cefaloridina (antibiótico).

ACTIVACION METABOLICA Y CITOTOXICIDAD

Los conceptos involucrados en la activación metabólica de drogas y su relación con la citotoxicidad, fueron desarrollados en 1966 durante los estudios sobre carcinogénesis química (1). Estos comprenden las siguientes consideraciones:

1. Transformación del agente en un metabolito activo capaz de inducir eventos nocivos para la célula. Entre ellos, es posible que el metabolito tóxico sea capaz de unirse irreversiblemente a biomoléculas esenciales, tales como

Abreviaturas: O_2^- : radical superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; HO^\bullet : radical hidróxilo; 1O_2 : oxígeno singlete; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida.

proteínas (enzimas), lípidos y ácidos nucleicos, que alteran sus funciones específicas y la homeostasis celular (2). En el caso de que la activación metabólica involucre la generación de radicales libres, moléculas de gran reactividad química, es posible que ellos ataquen a biomoléculas y provoquen alteraciones estructurales en ellas que pueden condicionar cambios funcionales como inactivación de enzimas, lipoperoxidación y mutaciones. De especial interés es el fenómeno de la lipoperoxidación, el cual consiste en un deterioro oxidativo de los ácidos grasos poli-insaturados que constituyen los fosfolípidos de las membranas celulares (3). El proceso se inicia por la generación de radicales libres del xenobiótico y/o del oxígeno (Fig. 1B). Como resultado, la peroxidación de los lípidos de membrana puede inducir cambios tanto en su permeabilidad y selectividad como en sus propiedades catalíticas y de recepción de mensajes biológicos. Si el agente inductor del proceso es lo suficientemente agresivo (tetracloruro de carbono, fenilhidrazina) o si interactúa con sistemas biológicos en forma periódica (acetaminofeno) o crónica (etanol), el fenómeno lipoperoxidativo puede conducir a la desestabilización de la estructura de las membranas, su posterior ruptura y la muerte celular (3, 4).

2. Debido al hecho de que la toxicidad se manifiesta en ciertos tejidos, se ha introducido el concepto de órgano blanco. El hígado es el órgano más frecuentemente afectado en esta situación por ser el tejido con mayor capacidad metabolizante de drogas en el organismo. Sin embargo, la toxicidad que ocurre en otros órganos con una capacidad metabólica mucho menor que la del hígado implicaría un transporte de metabolitos tóxicos desde este tejido hacia órganos blancos secundarios.

3. En el caso de algunas drogas tales como acetaminofeno, fenacetina y furesemida que son relativamente inocuas hasta que se alcanza una determinada concentración en el órgano blanco, existiría el concepto de dosis umbral de toxicidad.

4. Finalmente, frente a los tipos de agresión química las células están dotadas de sistemas de protección contra los metabolitos activos y radicales libres (5), que mantienen las reacciones tóxicas que ellos inducen a un nivel tal que sean insuficientes para producir daño. Entre estos sistemas están (Fig. 1):

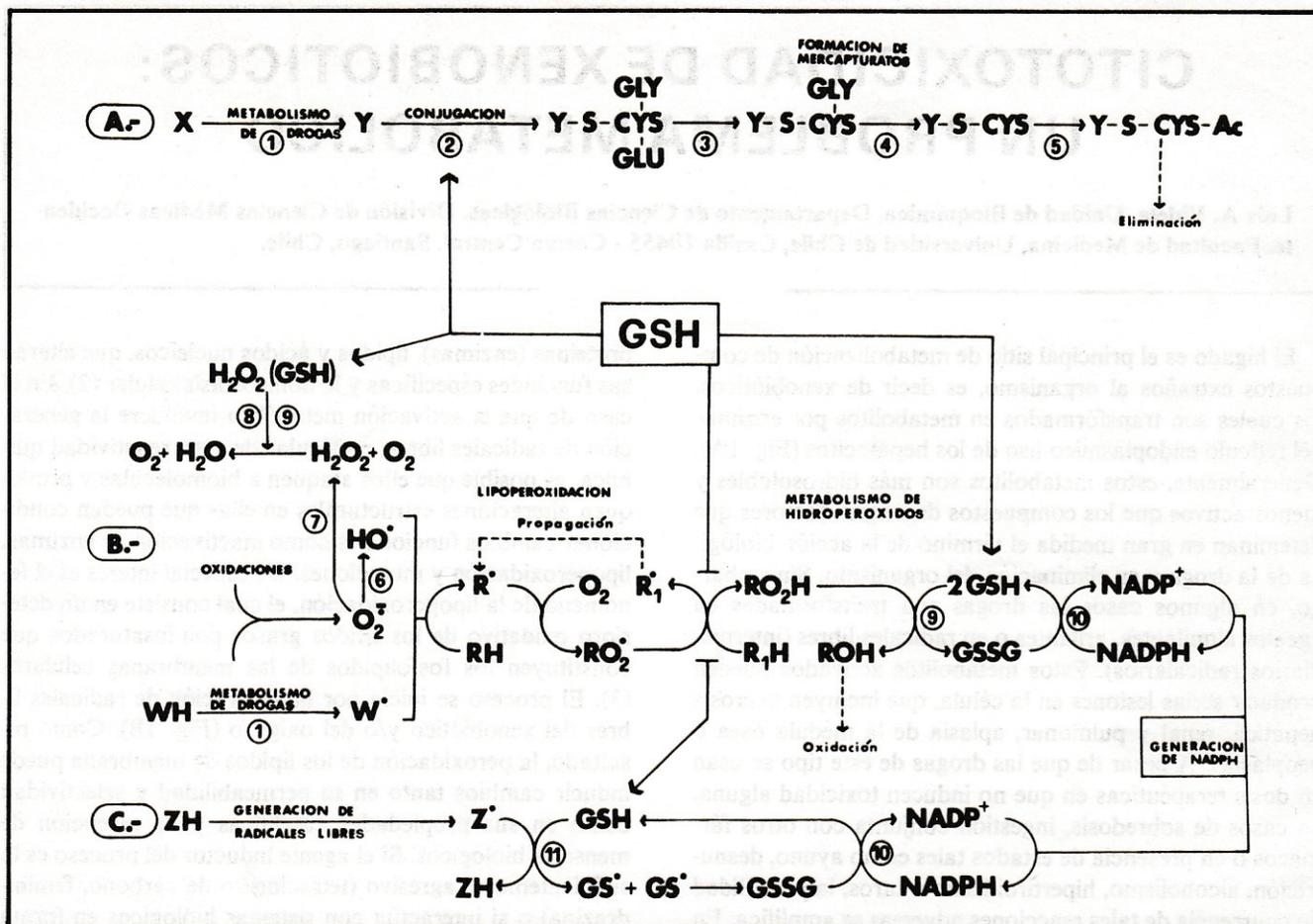


Figura 1. Participación del GSH en los sistemas de protección contra la citotoxicidad inducida por xenobióticos: A, conjugación con metabolitos de drogas (Y) que forman mercapturatos (Y-S-CYS-Ac); B, metabolismo de hidroperóxidos (RO₂H) formados por la generación de radicales libres en oxidaciones celulares (O₂⁻/HO[•]) o en el metabolismo de drogas (W[•], Z[•]); C, atrapamiento directo de radicales libres. Reacciones: 1, enzimas metabolizantes de xenobióticos; 2, glutatión-S-transferasas; 3, gama-glutamil transferasas; 4, cisteinilglicinasas; 5, N-acetilasa; 6, reacciones de Haber Weiss y/o Fenton; 7, superóxido dismutasa; 8 catalasa; 9, glutatión peroxidasa; 10, glutatión reductasa; 11, interconversión radicalaria. (modificado de referencia 4).

- El par enzimático superóxido dismutasa-catalasa encargado de degradar O₂⁻ y H₂O₂ respectivamente, que evitan así la generación de HO[•], el iniciador más eficiente del evento lipoperoxidativo.
- El par enzimático glutatión peroxidasa-glutatión reductasa involucrado en el catabolismo de hidroperóxidos derivados de los ácidos grasos no saturados, los cuales constituyen los productos finales del proceso lipoperoxidativo y son de alta citotoxicidad por ser potentes agentes oxidantes.
- Atrapadores de especies radicales (O₂⁻, HO[•], CCl₃, etc.) o excitadas (¹O₂), entre los cuales se pueden citar al GSH (estabiliza O₂⁻, HO[•] y ¹O₂), vitamina E o α-tocoferol (estabiliza ¹O₂ y radicales libres de ácidos grasos), vitamina C o ácido ascórbico (regenera la vitamina E reducida y atrapa O₂⁻) y la vitamina A o β-caroteno (estabiliza ¹O₂).

El GSH es, por lo tanto, la biomolécula de defensa más importante al participar en el catabolismo de hidroperóxi-

dos y H₂O₂ (Fig. 1B), por ser un atrapador directo de radicales libres (Fig. 1C) y por conjugarse con xenobióticos o sus metabolitos vía glutatión-S-transferasas en la vía de síntesis de mercapturatos (Fig. 1A). Este tripéptido hidrosoluble es, además, biosintetizable y puede ser regenerado a partir de GSSG vía la glutatión reductasa y sistemas productores de NADPH (Fig. 1).

EL HIGADO COMO ORGANO BLANCO DE TOXICIDAD

ACETAMINOFENO: Las dosis altas de acetaminofeno provocan lesiones hepáticas en el hombre y en animales de investigación (6, 7). En este último caso, la administración previa de agentes inductores de las enzimas metabolizantes de drogas como el fenobarbital, potencia la severidad de la necrosis hepática y la unión de metabolitos tóxicos a las biomoléculas. Por el contrario, al inhibir dicho sistema con CoCl₂, se previenen ambos efectos. Estos hechos indican que el acetaminofeno es convertido por las

enzimas, las microsomaes, a un intermediario arilante que se une irreversiblemente a biomoléculas del órgano blanco, el hígado, y produce el daño (2,7). La unión del metabolito del acetaminofeno a moléculas hepáticas no ocurre hasta que el 60% de la droga ha sido eliminada del hígado, condición en la cual la concentración de GSH disminuye al ser utilizado como vehículo de eliminación de dicho metabolito. Luego que las vías principales de eliminación del acetaminofeno (glucuronización y sulfatación) están saturadas y el hígado está desprovisto de GSH, se alcanzaría el umbral de toxicidad y el metabolito activo se combinaría con las moléculas hepáticas y provocaría la muerte celular por mecanismos aún no bien identificados (2,7). Recientemente se ha puntualizado que el nivel del GSH hepático es importante en determinar la hepatotoxicidad del acetaminofeno en el hombre, y que el uso de agentes sulfidrilicos como la cisteína, cisteamina y el dimercaprol en la terapia de pacientes intoxicados con este fármaco tiene éxito. En el caso de la fenacetina ocurre un mecanismo semejante.

ISONIAZIDA: El uso de la isoniazida en dosis terapéuticas provoca hepatitis en el hombre (8). Tanto en el hombre como en animales de investigación existe una correlación entre la extensión de la necrosis hepática y la unión a biomoléculas, el requerimiento del sistema metabolizante

de drogas microsomal y la protección con cisteína y GSH, de una manera similar al mecanismo descrito para el acetaminofeno (8,9). Sin embargo, en el caso de la isoniazida hay algunos hechos particulares importantes de destacar. Desde un punto de vista metabólico, la isoniazida requiere de una acetilación previa antes de ser transformada por las enzimas microsomaes en los metabolitos reactivos. Diversos estudios clínicos indican que existen individuos con características de acetiladores rápidos que tendrían mayores posibilidades de producción de daño hepático y de una severidad también mayor, al metabolizar más rápido la isoniazida. Otro factor que incide en este aspecto es la administración de otros fármacos conjuntamente con la isoniazida, los cuales pueden tener la capacidad de inducir el sistema microsomal metabolizante de drogas, es decir, aumentar la cantidad de las enzimas involucradas (9). La inducción enzimática puede tener dos consecuencias en la hepatotoxicidad asociada a la activación de drogas: a) aumentar el riesgo de incidencia de daño hepático y b) acortar el tiempo necesario para su aparición. Ambos aspectos se observan en el caso de la terapia antituberculósica con isoniazida y rifampicina, pues la rifampicina es un potente inductor de las enzimas microsomaes en el humano.

ALCOHOL: La ingesta excesiva y prolongada de etanol produce una variedad de cambios metabólicos y alte-

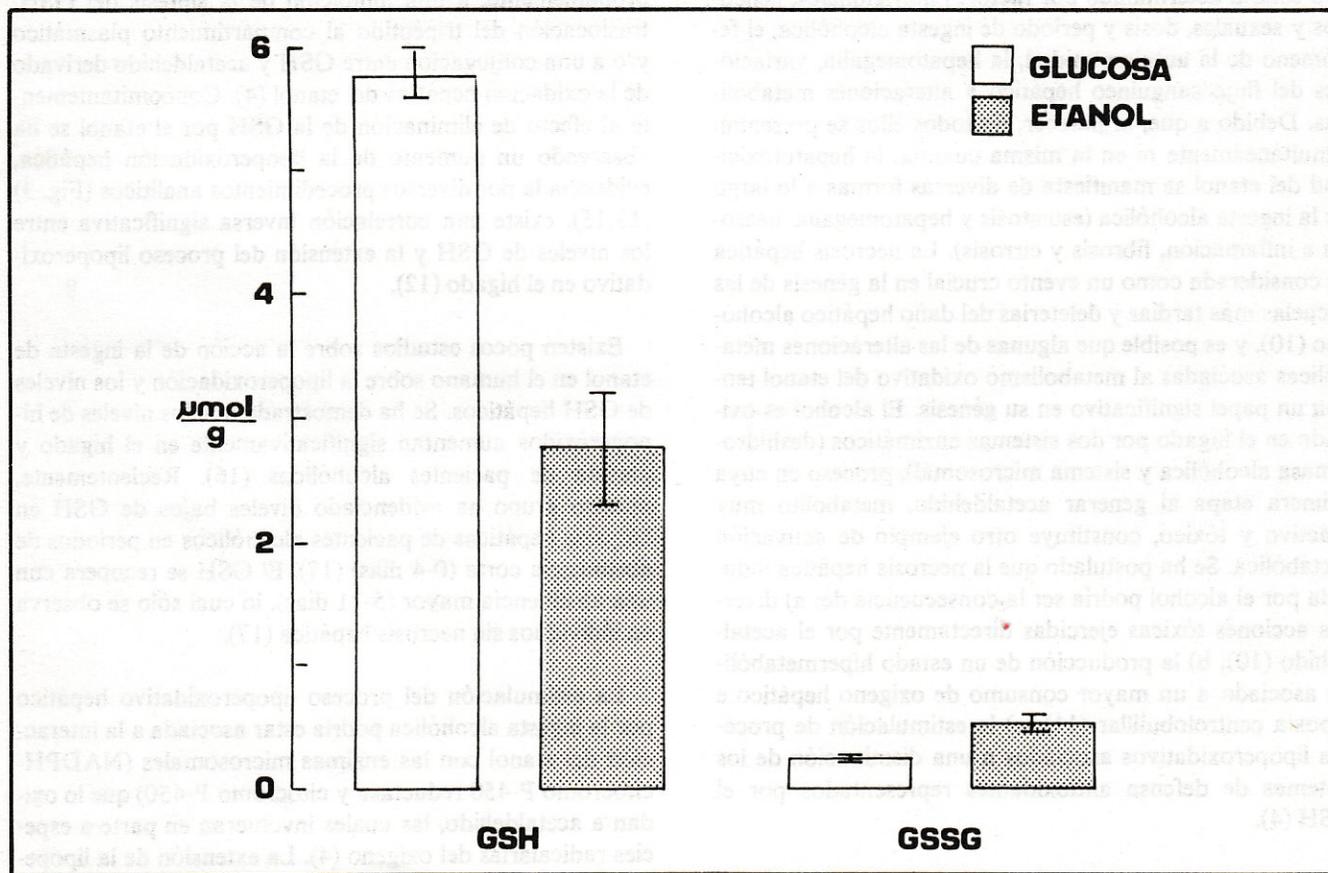


Figura 2. Efecto de la administración aguda de etanol sobre el contenido de GSH y GSSG hepáticos. Ratas Wistar macho ayunadas por 16 horas fueron intubadas y se les administro etanol (5 g/Kg) o glucosa isocalórica. Luego de 6 horas de tratamiento, los niveles de GSH y GSSG fueron determinados enzimáticamente (adaptado de referencia 18).

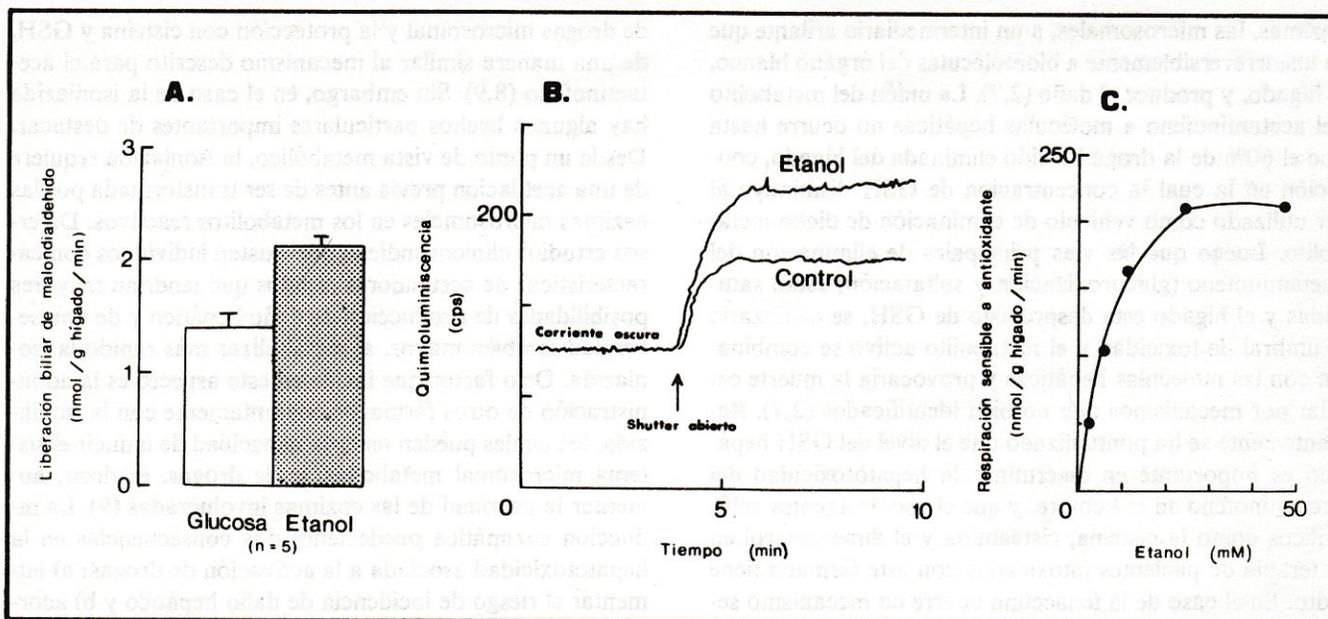


Figura 3. Índices lipoperoxidativos hepáticos bajo la influencia del etanol. A, liberación biliar de malondialdehído (Tratamiento descrito en Fig. 2) (13); B, quimioluminiscencia en el hígado in situ (Tratamiento descrito en Fig. 2) (14); C, respiración sensible a antioxidante en el hígado perfundido (15).

raciones estructurales en el hígado, cuyas causas parecen ser de naturaleza multifactorial. En las últimas décadas se ha postulado que la producción del daño hepático alcohólico estaría determinado por factores nutricionales, genéticos y sexuales, dosis y periodo de ingesta alcohólica, el fenómeno de la autoinmunidad, la hepatomegalia, variaciones del flujo sanguíneo hepático y alteraciones metabólicas. Debido a que, al parecer, no todos ellos se presentan simultáneamente ni en la misma cuantía, la hepatotoxicidad del etanol se manifiesta de diversas formas a lo largo de la ingesta alcohólica (esteatosis y hepatomegalia, necrosis e inflamación, fibrosis y cirrosis). La necrosis hepática es considerada como un evento crucial en la génesis de las secuelas más tardías y deletérias del daño hepático alcohólico (10), y es posible que algunas de las alteraciones metabólicas asociadas al metabolismo oxidativo del etanol tengan un papel significativo en su génesis. El alcohol es oxidado en el hígado por dos sistemas enzimáticos (deshidrogenasa alcohólica y sistema microsomal), proceso en cuya primera etapa al generar acetaldehído, metabolito muy reactivo y tóxico, constituye otro ejemplo de activación metabólica. Se ha postulado que la necrosis hepática inducida por el alcohol podría ser la consecuencia de: a) diversas acciones tóxicas ejercidas directamente por el acetaldehído (10); b) la producción de un estado hipermetabólico asociado a un mayor consumo de oxígeno hepático e hipoxia centrolobulillar (11); c) la estimulación de procesos lipoperoxidativos asociados a una disminución de los sistemas de defensa antioxidantes representados por el GSH (4).

A nivel de animales de experimentación, tanto la ingesta aguda (Fig. 2) como crónica de etanol provocan una marcada disminución de la concentración hepática de GSH

(4). En la intoxicación aguda se ha encontrado que un 20% de la disminución del GSH se puede dar cuenta por la aparición de GSSG en el tejido (Fig. 2). El resto se debe, probablemente, a una inhibición de la síntesis del GSH, traslocación del tripéptido al compartimiento plasmático y/o a una conjugación entre GSH y acetaldehído derivado de la oxidación hepática del etanol (4). Concomitantemente al efecto de eliminación de la GSH por el etanol se ha observado un aumento de la lipoperoxidación hepática, evidenciada por diversos procedimientos analíticos (Fig. 3) (13,15), existe una correlación inversa significativa entre los niveles de GSH y la extensión del proceso lipoperoxidativo en el hígado (12).

Existen pocos estudios sobre la acción de la ingesta de etanol en el humano sobre la lipoperoxidación y los niveles de GSH hepáticos. Se ha demostrado que los niveles de hipoperóxidos aumentan significativamente en el hígado y plasma de pacientes alcohólicos (16). Recientemente, nuestro grupo ha evidenciado niveles bajos de GSH en biopsias hepáticas de pacientes alcohólicos en periodos de abstinencia corta (0-4 días) (17). El GSH se recupera con una abstinencia mayor (5-21 días), lo cual sólo se observa en individuos sin necrosis hepática (17).

La estimulación del proceso lipoperoxidativo hepático por la ingesta alcohólica podría estar asociada a la interacción del etanol con las enzimas microsomales (NADPH-citocromo P-450 reductasa y citocromo P-450) que lo oxidan a acetaldehído, las cuales involucran en parte a especies radicalarias del oxígeno (4). La extensión de la lipoperoxidación inducida por el alcohol puede ser facilitada o potenciada por varios factores concomitantes del alcoholismo: a) inducción de los sistemas microsomales que me-

tabolizan etanol, lo cual determinaría una mayor generación de radicales libres pro-oxidantes; b) acúmulo de hierro hepático, el cual es un potente catalizador de la lipoperoxidación dependiente de NADPH a nivel microsomal (13); c) presencia de una nutrición deficitaria que podría determinar un nivel inadecuado de vitamina E y de los aminoácidos necesarios para la síntesis de GSH en el hígado, principales biomoléculas antioxidantes (4); d) la necrosis hepática inducida por el alcohol tendría su origen en las zonas centrales del lobulillo hepático, sectores caracterizados por tener un bajo contenido de GSH y de actividad glutatión-peroxidasa conjuntamente con una mayor actividad de enzimas microsomales que las zonas periportales, lo cual podría contribuir a desarrollar una elevada presión lipoperoxidativa centrolobulillar.

PERSPECTIVAS

La manifestación de la citotoxicidad provocada por metabolitos activos de xenobióticos depende de varios factores críticos. Entre ellos destacan: a) la velocidad de formación del intermediario activo, su reactividad y su velocidad de eliminación del sitio de acción; b) los niveles funcionales de los diversos mecanismos de defensa y c) la velocidad de reparación del daño producido. Los mecanismos por los cuales los metabolitos activos unidos a biomoléculas conducen a las alteraciones celulares vitales que no han sido aún identificadas. Es necesario, entonces, definir el tipo de interacciones que ocurren entre el metabolito activo y el órgano blanco, para intentar comprender como, por ejemplo que el proceso de N-oxidación puede conducir a la necrosis celular en el caso de un agente o inducir una neoplasia al administrar otro xenobiótico. Es de vital importancia una mejor comprensión de los mecanismos celulares de toxicidad por metabolitos activos, ya sea para determinar la terapia de elección de casos de intoxicación, para evitar o disminuir los fenómenos de citotoxicidad que pueden aparecer en casos de terapias múltiples y para aplicar enfoques más racionales en el diseño de agentes terapéuticos no-tóxicos en el futuro. Es de especial interés el estudio del uso de atrapadores de radicales libres en la enfermedad hepática alcohólica. En efecto, los bioflavonoides tales como el (+)-cianidanol-3 (14,15,18) y la silimarina (19) inhiben completamente la respuesta lipoperoxidativa del hígado inducida por la ingesta aguda de etanol, por lo cual estos fármacos podrían evitar la propagación del daño producido y facilitar la estabilización de las membranas celulares alteradas.

AGRADECIMIENTOS

Los estudios sobre el alcohol e hígado presentados en este trabajo y realizados por nuestro grupo de investigación, fueron financiados por el Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile (proyectos B-1162 y B-1860).

REFERENCIAS

1. MILLER, E.C. y MILLER, J.A. (1966). Mechanism of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol. Rev.* 18, 805-836.
2. MITCHELL, J.R. y JOLLOWS, D.F. (1979). Metabolic activation of drugs to toxic substances. *Gastroenterology* 68 392-410.
3. TAPPEL, A. (1973). Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 32, 1870-1874.
4. VIDELA, L.A. y VALENZUELA, A. (1982). Alcohol ingestion liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic interrelations and pathological implications. *Life Sci.* 31, 2395-2407.
5. FORMAN, H.J. y FISHER, A.B. (1981). Antioxidant defenses. En *Oxygen and Living Processes*. Editor: Gilbert, D.L. Springer-Verlag, New York, 235-249.
6. PRESCOTT, L.F., WRIGHT, N., ROSCOE, P. y BROWN, S.S. (1971). Plasma paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. *Lancet* 1, 519-522.
7. PESSAYRE, D., DOLDE, A., ARTIGOU, J.Y., WASDSCHER, J.C. DESCATOIRE, V., DEGOTT, C. y BENHAMOU, J.P. (1979). Effect of fasting on metabolite-mediated hepatotoxicity in the rat. *Gastroenterology* 77, 264-271.
8. BLANCK, M., MITCHELL, J.R., ZIMMERMAN, H.J., ISHAK, K. y EPLER, G. P. (1975). Isoniazid-associate hepatitis in 114 patients. *Gastroenterology* 69, 289-293.
9. PESSAYRE, D., BENTATA, M., DEGOTT, C., NOVEL, O., MIGUEL, J.P., RUEFF, B. y BENHAMOU, J.P. (1977). Isoniazid-rifampin fulminant hepatitis. A possible consequence of the enhancement of isoniazid hepatotoxicity by enzyme induction. *Gastroenterology* 72, 284-289.
10. LIEBER, C.S. (1978). Pathogenesis and early diagnosis of alcoholic liver injury. *New Engl. J. Med.* 298, 888-893.
11. ISRAEL, Y., VIDELA, L. y BERNSTEIN, J. (1975). Liver hypermetabolic state after chronic ethanol consumption: hormonal interrelations and pathogenic implications. *Fed. Proc.* 34, 2052-2059.
12. VIDELA, L.A., FERNANDEZ, V., UGARTE, G. y VALENZUELA, A. (1980). Effect of acute ethanol intoxication on the content of reduced glutathione of

the liver in relation to its lipoperoxidative capacity in the rat. *FEBS Lett.* 111, 6-10.

13. VALENZUELA, A., FERNANDEZ, V. VIDELA, L.A. (1983). Hepatic and biliary levels of glutathione and lipid peroxides following iron overload in the rat: effects of simultaneous ethanol administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 70, 87-95.
14. VIDELA, L.A., FRAGA, C.G., KOCH, O.R. y BOVERIS, A. (1983). Chemiluminescence of the *in situ* rat liver after acute ethanol intoxication. Effect of (+)-cyanidanol-3. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2822-2825.
15. VIDELA, L.A. (1984). Hepatic antioxidant —sensitive respiration. Effect of ethanol, iron and mitochondrial uncoupling. *Biochem. J.* 223, 885-891.
16. SUEMATSU, T., MATSUMURA, T., SATO, N., MIYAMOTO, T., OOKA, T., KAMADA, T. y ABE, H. (1981). Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in human. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 5, 427-430.
17. VIDELA, L.A., ITURRIAGA, H., PINO, M.E., BUNOUT, D., VALENZUELA, A. y UGARTE, G. (1984). Content of hepatic reduced glutathione in chronic alcoholic patients: influence of the length of abstinence and liver necrosis. *Clin. Sci.* 66,283-290.
18. VIDELA, L.A., FERNANDEZ, V., VALENZUELA, A. y UGARTE G. (1981). Effects of (+)-cyanidanol-3 on the changes in liver glutathione content and lipoperoxidation induced by acute ethanol administration in the rat. *Pharmacology* 22, 343-348.
19. VALENZUELA, A., LAGOS, C., SCHMIDT, K. y VIDELA, L.A. (1985). Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2209-2212.

LOS MECANISMOS PARA EVALUAR LA EVOLUCION A NIVEL BIOQUIMICO

Raúl Arredondo Peter. Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.
Prolongación Carpio y Plan de Ayala, Colonia Santo Tomás, México, D.F.

La diversidad de la vida es sorprendente, se han descrito y clasificado aproximadamente 400 000 especies de plantas y 1 500 000 de animales; sin embargo, el censo está lejos de ser completo. La diversidad del mundo viviente aparentemente no es sólo en el gran número de especies, sino también en su heterogeneidad.

A pesar de su prodigiosa diversidad, los organismos vivos muestran mucho en común. El oxígeno, el hidrógeno y

el carbono, son elementos químicos comunes en todos los organismos; ellos juntos constituyen aproximadamente el 98.5% del peso de cualquier ser viviente. Los cuatro tipos de macromoléculas principales —las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y los ácidos nucleicos— son los constituyentes básicos de todos los procesos vivientes. La información genética de todos los organismos, de las bacterias al hombre, está codificada en la estructura doble helicoidal del DNA. Los procesos de transcripción y traducción, y el

Glosario

ANALOGIA, semejanzas fenotípicas entre diferentes grupos de organismos, determinadas por la función que desempeñan y que no involucran alguna relación ancestral.

ANCESTRO, carácter fenotípico que se ha modificado a través del tiempo para originar caracteres actuales relacionados.

CLADOGRAMA, relaciones filogenéticas entre diferentes organismos representadas en forma de árbol, toma en cuenta las relaciones ancestrales y las características de éstas.

DENDROGRAMA, diagrama semejante a un árbol que representa relaciones actuales y/o filogenéticas entre diferentes organismos.

ETOLOGIA, estudio del comportamiento.

FENOGRAMA, relación actual entre diferentes organismos repre-

sentada en forma de árbol, sin tomar en cuenta las relaciones ancestrales.

FILOGENIA, historia y relaciones evolutivas dentro de un grupo de organismos.

FOSIL VIVIENTE, correctamente denominado como organismo pancrónico, el cual ha sufrido escasos cambios fenotípicos en largos periodos de tiempo.

HOMOLOGIA, relaciones fenotípicas entre diferentes grupos de organismos que se originaron a partir de un ancestro común.

PARSIMONIA, sinónimo de economía, método utilizado para determinar las relaciones filogenéticas que contemplan el menor número de cambios evolutivos entre diferentes organismos.

código genético, son esencialmente uniformes a través de todos los seres vivos.

Ninguna clasificación moderna de la vida ignora completamente la evolución. En este ensayo se discutirán los métodos que se utilizan para inferir relaciones de descendencia evolutiva, es decir, la filogenia, con base en semejanzas y diferencias.

Las relaciones filogenéticas se determinan apoyándose en muchas fuentes de evidencias complementarias. En primer lugar, se obtienen vestigios de vida en el pasado mediante el registro fósil, que en algunos casos proporciona evidencias de relaciones filogenéticas entre grupos de organismos, sin embargo, generalmente el registro fósil está incompleto, lo que representa serios problemas. Segundo, los estudios comparados de formas vivientes también proporcionan información acerca de la filogenia. La anatomía comparada es la rama de la ciencia que en el pasado aportó la mayor cantidad de información, auxiliada de la embriología comparada, citología, etología, biogeografía y otras disciplinas biológicas. En años recientes el estudio comparado de las macromoléculas que contienen información, como las proteínas y los ácidos nucleicos, ha llegado a ser una poderosa herramienta para el estudio de la filogenia (1).

Muchas proteínas y ácidos nucleicos son fósiles vivientes, en el sentido de que sus estructuras se han conservado dinámicamente durante el proceso evolutivo por millones de años. Sus secuencias de aminoácidos y nucleótidos se encuentran hoy en día como formas relacionadas en protocariotes y eucariotes, las cuales evolucionaron de secuencias ancestrales comunes por medio de un gran número de pequeños cambios. Es la esperanza de muchos investigadores el que estas secuencias aporten todavía suficiente información para revelar la evolución temprana de las especies y sus procesos bioquímicos y fisiológicos (2).

Los estudios comparados de proteínas y ácidos nucleicos, proporcionan estimaciones cuantitativas del grado de homología entre los organismos. Los métodos que se utilizan para distinguir la homología de la similitud accidental, se contemplan bajo dos criterios complementarios. Con respecto a cualquier característica determinada, 1) el mayor número de características similares entre dos organismos, sugiere homología y por lo tanto un ancestro común y 2) la disminución en el parecido de cualquier característica sugiere homología (Simpson, 1961, en (1)).

Como una regla, las similitudes que se deben a la analogía, y en general a la evolución paralela o convergente, carecen de una correspondencia detallada de las partes que se observan en los casos de homología; las semejanzas que se presentan entre dos estructuras se deben principalmente a la similitud en la función, pero no están relacionadas por un ancestro común.

La determinación de las relaciones filogenéticas, con base en el conocimiento anatómico, embriológico, conductual y ecológico, requiere del estudio intensivo de la biología del organismo. Sin embargo, los siguientes métodos se pueden aplicar sin mucho conocimiento de la biología del organismo en estudio. La mayoría de ellos se basan en el estudio directo del DNA y las proteínas y son extremadamente útiles para establecer relaciones filogenéticas, aunque deben complementarse con información que proceda de estudios bioquímicos, cromosómicos, anatómicos, embriológicos, etológicos, ecológicos, biogeográficos y paleontológicos.

METODO DE HIBRIDIZACION DEL DNA

La información genética está codificada en la secuencia de nucleótidos del DNA. El grado de diferenciación genética entre dos especies se puede medir por la proporción de pares de nucleótidos que son diferentes en su DNA. Esto se puede llevar a cabo al formar moléculas híbridas entre cadenas simples de DNA de organismos diferentes. Doty y colaboradores (3) descubrieron que las dos cadenas de DNA pueden disociarse y reasociarse *in vitro* y obtener moléculas híbridas de cadenas simples que provengan de dos especies diferentes de bacterias y virus. Tiempo después se utilizó esta técnica para medir las diferencias del DNA entre otras especies.

Se pueden obtener por hibridación dos medidas distintas de las diferencias del DNA: 1) el grado de reacción de hibridación, es decir, la fracción del DNA de dos especies que forma moléculas híbridas; 2) la proporción de pares de nucleótidos que son complementarios en estas moléculas híbridas. Las cadenas simples de DNA se pueden reasociar en moléculas de doble cadena aunque no todos los pares de nucleótidos sean complementarios. La proporción de pares de nucleótidos no complementarios se estima por la determinación de la temperatura en la cual las dos cadenas de la molécula de DNA híbrido se separan. El parámetro crítico, denominado estabilidad térmica (TS), es la temperatura en la cual el 50% del DNA se disocia. La diferencia ΔTS , entre la TS del DNA híbrido y el control, es en forma aproximada directamente proporcional a la cantidad de nucleótidos no apareados en el DNA híbrido. Los experimentos recientes indican que cada grado centígrado en ΔTS corresponde a 0.65% de nucleótidos mal apareados (McCarthy y Färquhar 1947, en (1)). Sin embargo, estas estimaciones están sujetas al error experimental.

En la figura 1, se muestra un árbol filogenético de algunos géneros que se relacionan con el gorrión, *Passer domesticus*. Se determinaron las estabilidades térmicas utilizando como referencias para unión al DNA, en primer lugar al junco coloreado, *Junco hyemalis* y posteriormente al tordo ermitaño *Catharus guttatus*. Los datos de estas comparaciones se combinaron para construir la filogenia.

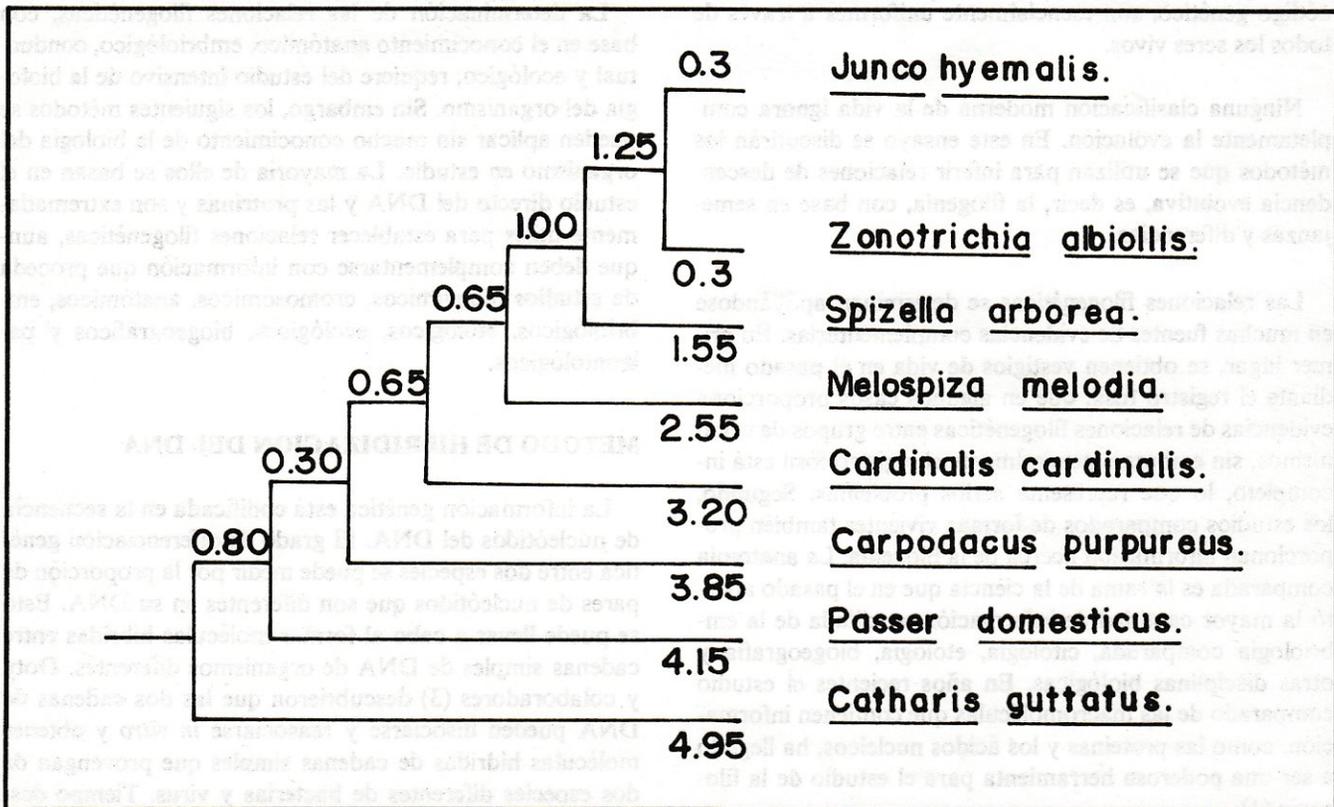


Figura 1. Filogenia de algunas especies de aves relacionadas con el gorrión, *Passer domesticus*, basada en los perfiles de estabilidad térmica de los duplex hidridos del DNA. Los valores en la columna representan la distancia, expresada como ΔTS , entre los diferentes géneros y los valores en la diagonal representan las distancias entre los géneros y sus ancestros hipotéticos o puntos de divergencia (4).

Los números en las ramas corresponden a las diferencias en estabilidad térmica, ΔTS y por lo tanto corresponden aproximadamente al porcentaje de reemplazamientos de nucleótidos que ha ocurrido en la evolución de cada rama (4).

MEDIDAS ELECTROFORETICAS DE LA DIFERENCIACION GENETICA

En años recientes la electroforesis en gel se ha utilizado para medir la diferenciación genética entre especies relacionadas en varios grupos de organismos, de plantas anuales, insectos y otros invertebrados, así como de peces, reptiles, anfibios y mamíferos (para revisión consultar (5)). Estos estudios han proporcionado una gran cantidad de información relevante acerca de sus relaciones filogenéticas.

Los datos que se obtienen por electroforesis son frecuencias génicas y genotípicas para alelos detectables electroforéticamente. Las frecuencias génicas y genotípicas que se observan en dos especies diferentes se transforman en medidas de distancia genética utilizando cualquier método estadístico. Dos de estos métodos, ampliamente utilizados, son la "identidad genética" I , y la "distancia genética", D , que se calculan como sigue (6): Considérese que A

y B son dos poblaciones diferentes y l es un locus dado. La probabilidad normalizada de que dos alelos, uno de cada población, sean idénticos es:

$$I_1 = \frac{\sum a_i b_i}{\sqrt{\sum a_i^2 b_i^2}}$$

donde a_i y b_i son las frecuencias del alelo de orden i en las poblaciones A y B , respectivamente. I_1 es igual a uno cuando las dos poblaciones tienen los mismos alelos en frecuencias idénticas y cero cuando las dos poblaciones no tienen alelos en común. Cuando se consideran muchos loci, la "identidad genética media" se define como:

$$I = \frac{J_{AB}}{\sqrt{J_A J_B}}$$

donde J_{AB} , J_A y J_B , son las medias aritméticas de los loci totales que se muestrearon, de $a_i b_i$, a_i^2 y b_i^2 , respectivamente. El valor de I puede fluctuar desde cero, diferencia genética completa, a uno, identidad genética completa.

La distancia genética media D , entre dos poblaciones se define como, $D = -\log_e I$, donde D puede fluctuar desde cero, ninguna diferencia genética, hasta infinito. Si se supone que las substituciones de nucleótidos dentro de un

gene ocurren independientemente unas de otras y que el número de estas substituciones por *locus* sigue una distribución de Poisson, D se puede interpretar como una medida del número promedio de substituciones de nucleótidos electroforéticamente detectables, que se han acumulado en la evolución de dos poblaciones desde que éstas se separaron de un ancestro común.

Supóngase ahora que una serie de *loci* se han estudiado por electroforesis en cada uno de los grupos de las especies relacionadas. Los valores de D para todas las comparaciones entre pares de especies en un grupo, se pueden utilizar para construir un dendrograma (diagrama semejante a un árbol), que refleja las afinidades genéticas entre las especies. Se pueden emplear diversos métodos matemáticos para construir dendrogramas basados en medidas de distancia genética. Los diferentes métodos no siempre producen dendrogramas idénticos, aunque los resultados generalmente son muy similares. Algunos de los métodos que se utilizan para agrupar especies se tratarán más adelante.

TECNICAS INMUNOLOGICAS

La estimación del grado de similitud entre proteínas se puede obtener por técnicas inmunológicas, tales como la inmunoelectroforesis, inmunodifusión, precipitación cuan-

titativa, fijación del complemento y turbidimetría. Los anticuerpos que se producen en un animal inmunizado, generalmente un conejo, reaccionan no solamente contra el antígeno específico utilizado, por ejemplo albúmina humana, sino también contra otras proteínas relacionadas, tales como albúminas de otros primates. Conforme mayor sea la similitud entre la proteína utilizada para inmunizar al conejo y la proteína probada, se presentará un mayor grado de reacción inmunológica. El grado de diferencia entre dos proteínas probadas de diferentes especies, se expresa como "distancia inmunológica" (1).

FILOGENIAS PROTEICAS

El grado de diferenciación o distancia, entre dos proteínas homólogas de secuencia de residuos de aminoácidos conocida, se puede medir de dos maneras. Primero, por una simple cuenta del número de diferencias de residuos de aminoácidos entre dos secuencias dadas. Por ejemplo, los citocromos c del hombre y del mono *Rhesus* difieren en un aminoácido (en la posición 66), los del hombre y del caballo en 11 aminoácidos (en las posiciones 19, 20, 23, 54, 55, 58, 66, 68, 91, 97 y 100) y así sucesivamente.

Un segundo procedimiento, el cual produce más información que el primero, hace uso del código genético. El

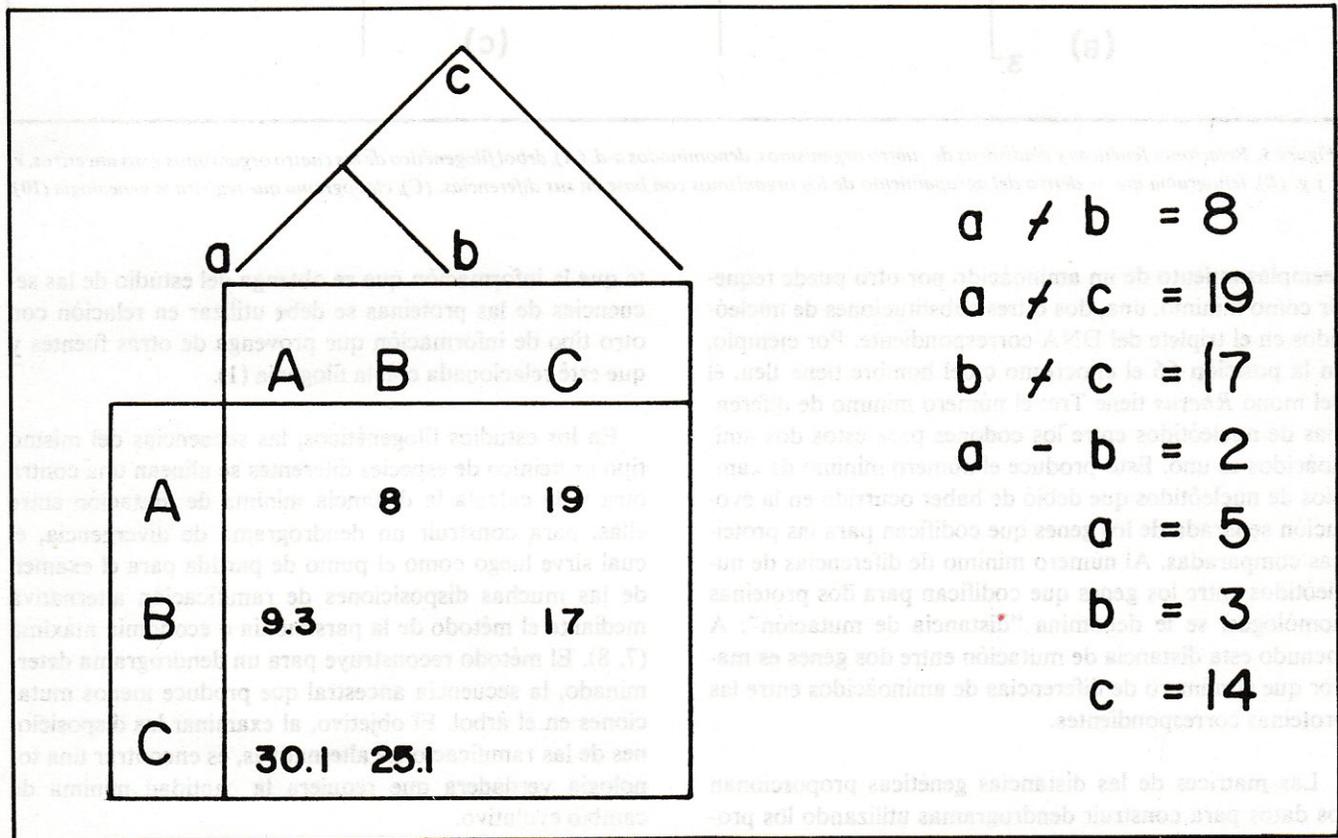


Figura 2. Asignación de valores respecto a la cantidad de cambio a las distintas ramas de un árbol filogenético (9). Los valores de a, b y c se desfasan de las ecuaciones de la derecha.

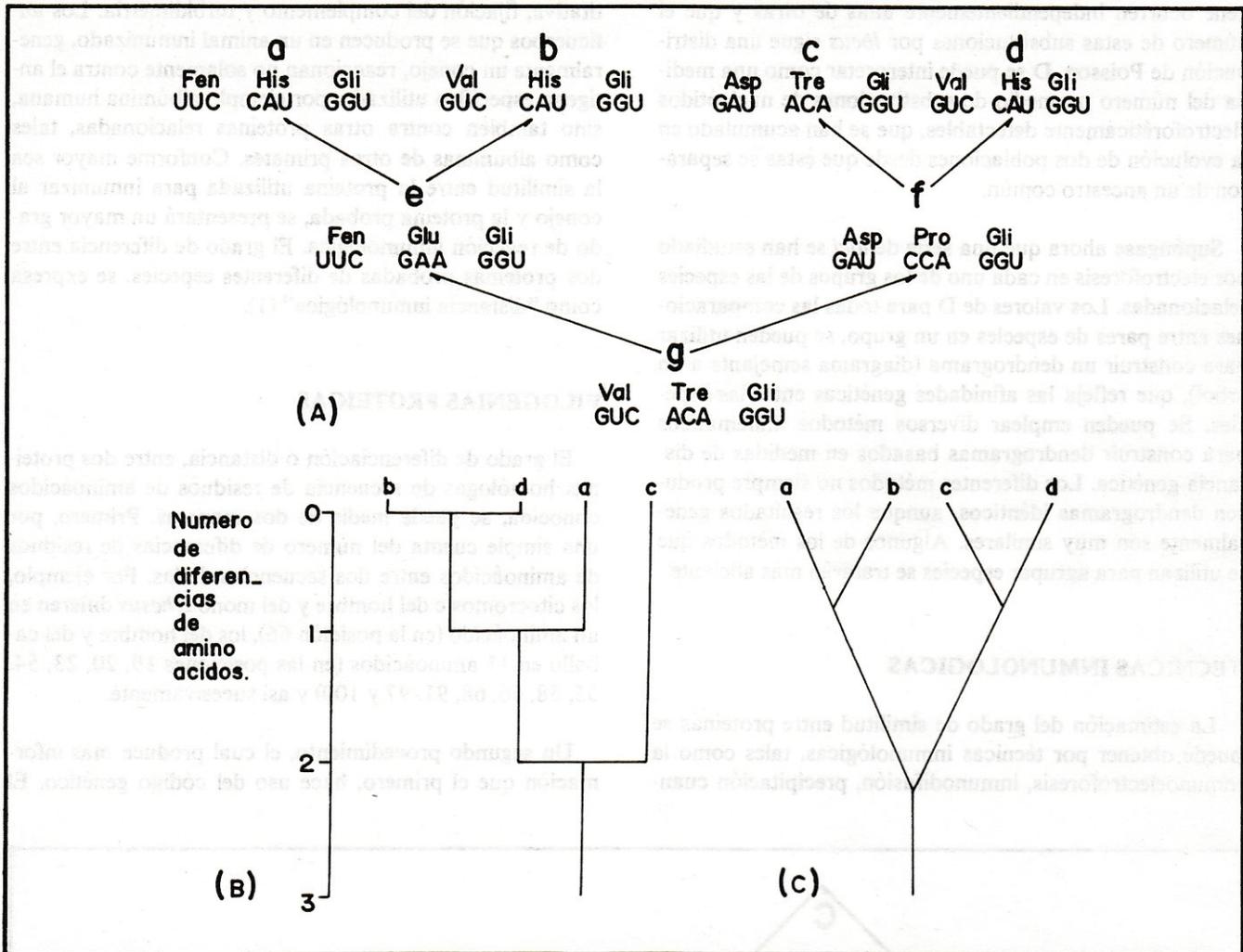


Figura 3. Relaciones fenéticas y cladísticas de cuatro organismos, denominados a-d. (A), árbol filogenético de los cuatro organismos y sus ancestros, e, f y g. (B), fenograma que se deriva del agrupamiento de los organismos con base en sus diferencias. (C), cladograma que registra la genealogía (10).

reemplazamiento de un aminoácido por otro puede requerir como mínimo, una, dos o tres sustituciones de nucleótidos en el triplete del DNA correspondiente. Por ejemplo, en la posición 66 el citocromo c del hombre tiene Ileu, el del mono *Rhesus* tiene Tre; el número mínimo de diferencias de nucleótidos entre los codones para estos dos aminoácidos es uno. Esto produce el número mínimo de cambios de nucleótidos que debió de haber ocurrido en la evolución separada de los genes que codifican para las proteínas comparadas. Al número mínimo de diferencias de nucleótidos entre los genes que codifican para dos proteínas homólogas, se le denomina "distancia de mutación". A menudo esta distancia de mutación entre dos genes es mayor que el número de diferencias de aminoácidos entre las proteínas correspondientes.

Las matrices de las distancias genéticas proporcionan los datos para construir dendrogramas utilizando los procedimientos de agrupamiento, u otros medios designados específicamente para trabajar con la estructura primaria de las proteínas. Sin embargo, es importante tener en men-

te que la información que se obtenga del estudio de las secuencias de las proteínas se debe utilizar en relación con otro tipo de información que provenga de otras fuentes y que esté relacionada con la filogenia (1).

En los estudios filogenéticos, las secuencias del mismo tipo proteínico de especies diferentes se alinean una contra otra y se calcula la distancia mínima de mutación entre ellas, para construir un dendrograma de divergencia, el cual sirve luego como el punto de partida para el examen de las muchas disposiciones de ramificación alternativa mediante el método de la parsimonia o economía máxima (7, 8). El método reconstruye para un dendrograma determinado, la secuencia ancestral que produce menos mutaciones en el árbol. El objetivo, al examinar las disposiciones de las ramificaciones alternativas, es encontrar una topología verdadera que requiera la cantidad mínima de cambio evolutivo.

Debido a que los sucesos sólo se producen en la escala cronológica de milenios, su regularidad sólo se puede exa-

minar según cierta hipótesis evolutiva, que distribuya los sucesos en los distintos intervalos históricos. Esto implica usar el conjunto de distancias pares entre los grupos taxonómicos (*taxa*) de la manera que muestra la figura 2, en la cual se supone que se dispone de cierta medida de la distancia, o disimilitud, como por ejemplo, el número de aminoácidos diferentes para una misma proteína en dos especies distintas, entre todos los pares posibles de *taxa* que se están analizando. La parte superior derecha de la matriz aporta un ejemplo hipotético para los tres *taxa* A, B y C. El árbol por encima de la matriz presenta ramas de longitud a, b y c, que conectan los *taxa* a un nudo común. El problema es determinar los valores de a, b y c, si se conocen los valores de la matriz. La relación entre los datos observados y los esperados se indica como ejemplo en las ecuaciones de la derecha, al igual que su solución. El procedimiento se aplica igualmente bien si A, B y C son conjuntos de *taxa* y los valores de la matriz son distancias promedio. En la parte inferior izquierda de la matriz, se presenta el número de sustituciones de aminoácidos que se podría esperar que se hubieran producido, con objeto de observar los datos de la mitad superior derecha si los últimos fueran los números de diferencias de aminoácidos que se observan entre 30 poblaciones variables. Si existen más de tres *taxa*, el proceso se repite tantas veces como nudos de bifurcación haya, siendo la única diferencia que A, B y C se convierten en colecciones de uno o más *taxa* y las tres distancias se convierten en el promedio de todas las distancias pares entre los miembros de los conjuntos (9).

Además, se requieren transformaciones para las secuencias proteicas debido a que las mutaciones dobles e inversas no se detectan por cuentas simples de secuencias. Se han propuesto dos series de correcciones. La primera es teórica y se sugirió por Margoliash y Smith en 1965 (contenido en (10)), en la cual el número de cambios esperados, D' , es $n \ln(n/(n-D))$, donde hay D diferencias observadas en n sitios. Por lo tanto, el 50% de D corresponde al 69.3% de D' . La segunda, utilizada por Dayhoff y colaboradores en 1972 (contenido en (10)), es empírica y se basa en la frecuencia conocida de puntos de mutación entre diferentes residuos de aminoácidos, determinada para numerosas secuencias; el cambio evolutivo ya corregido se expresa como porcentaje de mutaciones aceptadas (PAMs), en donde el 50% de D corresponde a 83 PAMs. Una extensa revisión sobre diversos métodos numéricos para la construcción de filogenias se puede encontrar en el trabajo de Sneath y Sokal (11).

A las relaciones que registran la similitud de las propiedades contemporáneas de los organismos, sin referencia a cómo llegaron a adquirirlas, se les denomina fenéticas; esto no es un sinónimo de relación fenotípica, ya que ésta incluye relaciones genéticas en el sentido de similitud entre el estado actual de sus genomas (Staines 1971, contenido en (11)). En cambio, la relación cladística describe la relación por diversas rutas evolutivas tomando en cuenta a los ancestros; se refiere a cómo se produjeron los caracteres

de los organismos, pero no a sus propiedades actuales. La relación cladística y fenética es discordante si ha ocurrido mucha evolución convergente o paralela, o si las velocidades de evolución han sido muy diferentes.

Las relaciones fenéticas se representan por fenogramas y las cladísticas por cladogramas, los cuales son dos tipos de dendrogramas. La figura 3 ilustra un ejemplo hipotético que se basa en tres posiciones en una secuencia proteica. Puede observarse que los organismos b y d han convergido en los caracteres que se muestran y son idénticos en éstos. Consecuentemente el fenograma y el cladograma son discordantes. Las clasificaciones fenéticas se requieren inicialmente para agrupar organismos en *taxa* lo más homogéneos posible, convencionalmente en especies (10).

Una observación importante es que si la evolución es constante y divergente, las relaciones fenéticas resultantes se ajustarán perfectamente a un dendrograma. Esta propiedad se conoce como "ultramétrica", y es una consecuencia del hecho de que todos los descendientes en una rama de un ancestro común están igualmente relacionados en el tiempo a todos los descendientes de la otra rama. Las secuencias proteicas a menudo presentan un alto grado ultramétrico y la importancia de esto es que cuando se mantiene esta propiedad, permite una fácil reconstrucción cladística y una buena estimación del tiempo geológico de divergencia (10).

En resumen, estos métodos se dividen principalmente en tres clases. En primer lugar, aquellos que se basan en matrices de semejanza, sin tomar en cuenta los caracteres y los estados del carácter. Intentan reconstruir la cladogenia a partir de una tabla de relaciones fenéticas, por ejemplo el apareamiento del DNA. La segunda clase requiere del conocimiento de los caracteres y sus estados, por ejemplo la secuencia de proteínas. La tercera clase, requiere del conocimiento de cuales estados del carácter son primitivos, aunque ésta es de poco uso debido a la dificultad para decidir cuales estados son primitivos.

Las cladogenias más convincentes se han hecho utilizando este tipo de secuencias de proteínas. Fitch y Margoliash en 1970 (en (10)) establecen las razones: la cantidad de información en una secuencia es grande; el comportamiento evolutivo de las proteínas parece seguir reglas relativamente regulares; las conclusiones concuerdan en alto grado con las evidencias geológicas, cuando éstas están disponibles; permiten comparaciones entre grupos taxonómicos distantes y en periodos largos; las homologías usualmente no son ambiguas; mediante ellas es posible detectar delecciones en las secuencias y reduplicaciones génicas, como en el caso de las globinas. A estas ventajas se les puede adicionar que las secuencias de proteínas generalmente tienen propiedades ultramétricas razonables, dentro de una familia de proteínas, aunque las velocidades evolutivas varíen ampliamente para diferentes familias.

CONCLUSION

Las moléculas que contienen información tales como las proteínas y los ácidos nucleicos, contienen información significativa para estudios de la filogenia. La velocidad de evolución molecular no es constante, y los cambios proteicos pueden utilizarse como un reloj evolutivo aproximado. La aplicación de la secuenciación de proteínas al estudio de la filogenia es un campo relativamente joven, sin embargo, en el futuro el estudio de las proteínas y los ácidos nucleicos contribuirá significativamente al conocimiento del registro evolutivo.

REFERENCIAS

1. Dobzhansky, T., Ayala, F. J., Stebbins, G. L. y Valentine, J. W. (1977). *Evolution*. W. H. Freeman and Co., San Francisco, USA. 572.
2. Dayhoff, M. O. (1978). *Atlas of Protein Structure and Sequence*. Vol. 5 Suppl. 3, Natl. Biomed. Res. Found. USA. 413.
3. Doty, P. J., Marmur, J., Eigner, J. y Skildkraut, C. (1960). Strand Separation and Specific Recombination in Deoxyribonucleic Acids: Physical Chemical Studies. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA*. 46: 461-476.
4. Shields, G. F. y Straus, N. A. (1975). DNA-DNA Hybridization Studies of Birds. *EVOLUTION*. 29: 159-166.
5. Manwell, C. y Baker, C. M. A. (1970). *Molecular Biology and the Origin of Species: Heterosis, Protein Polymorphism and Animal Breeding*. Univ. of Washington Press, USA. 394.
6. Nei, M. (1972). Genetic Distance Between Populations. *AMER. NAT.* 106: 283-291.
7. Moore, G.W., Barnabas, J. y Goodman, M. (1973). A Method for Constructing Maximum Parsimony Ancestral Amino Acid Sequences on a Given Network. *J. THEOR. BIOL.* 38: 459-485.
8. Goodman, M. (1980). Secuencias Proteicas en la Filogenia. En: *Evolución Molecular* (Ayala, F. J., ed.). Omega, Barcelona, España. 146-164.
9. Fitch, W. M. (1980). Relojes Evolutivos Moleculares. En: *Evolución Molecular* (Ayala, F. J., ed.). Omega, Barcelona, España. 165-184.
10. Sneath, P. H. A. (1974). Phylogeny of Microorganisms. *SYM. SOC. GEN. MICROBIOL.* 24: 1-39.
11. Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973). *Numerical Taxonomy: The Principle and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman and Co., San Francisco, USA. 573.

EXTRACCION DE RNA DE TEJIDOS VEGETALES. COMPARACION DE TRES METODOS

I. Bernal-Lugo, Ma. del C. Parra González, M. Gavilanes, División de Estudios de Posgrado, Departamento de Bioquímica Vegetal, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F.

INTRODUCCION

La biología molecular es una disciplina que se ha desarrollado rápidamente en los últimos años y la tecnología que ha surgido de este desarrollo ha experimentado también grandes avances. La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye una de las fases iniciales en muchos procedimientos utilizados en la genética y en la biología molecular.

Aunque existen muchas técnicas de aislamiento del RNA total de células animales, éstas no pueden ser extra-

poladas directamente a los tejidos vegetales por varias razones, dadas fundamentalmente por la estructura y función de la célula vegetal y que son: a) presencia de niveles elevados de nucleasas; b) presencia de pared celular; c) alto contenido de carbohidratos. La magnitud de estos factores depende del tipo de tejido, de su edad y de su estado metabólico surgiendo problemas metodológicos que no pueden ser resueltos por una sola técnica de extracción de RNA. Este hecho ha originado la necesidad de combinar varias técnicas de las utilizadas en tejidos animales, adaptándolas para resolver los problemas inherentes a los teji-

TABLA I

AGENTES UTILIZADOS EN TRES DIFERENTES METODOS DE AISLAMIENTO DE ACIDO RIBONUCLEICO

Método	Agente Desproteinizante	Inhibidor de RNasa	Agente Precipitante de RNA
Fenol	Fenol	SDS EDTA	Etanol
Clorhidrato de Guanidina	Clorhidrato de Guanidina	Clorhidrato de Guanidina	Etanol
Proteinasa K	Proteinasa K	SDS EDTA	Cloruro de Litio

dos vegetales. Fundamentalmente, el proceso de extracción de RNA consta de 5 fases: 1) Homogenización del tejido vegetal; 2) Separación de residuos celulares; 3) Desproteización; 4) Precipitación del RNA; 5) Purificación del RNA.

En este estudio hemos considerado tres técnicas para la extracción de RNA cuyas diferencias subyacen en alguna de las cinco fases antes mencionadas. Estas son la de la proteinasa K, la del clorhidrato de guanidina y la del fenol (1 y 2). El objetivo de este trabajo es evaluar el rendimiento y la calidad (incluyendo la actividad biológica) del RNA, producto de la extracción de cada uno de los tres métodos, cuando el tejido vegetal utilizado es el de aleuronas de semillas de cebada. Asimismo, se pretende que la presentación de esta metodología muestre cuán sencillo y fácil es su manejo, así como su implementación no sólo en laboratorios de investigación, sino también en laboratorios de docencia.

MATERIALES Y METODOS

Todo el material utilizado en el desarrollo de este trabajo fue tratado previamente en dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.5% a ebullición, durante 10' y enjuagado rigurosamente con agua bidestilada previamente agitada con dietil pirocarbonato al 0.1% y esterilizado en autoclave durante una hora. Posteriormente el material de vidrio se horneó durante toda la noche a 200°C; el material de plástico se esterilizó en autoclave durante una hora. Tanto los tratamientos anteriores como la manipulación experimental, se llevaron a cabo usando guantes. Estas precauciones se requieren para evitar la contaminación por ribonucleasa.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y sin purificación posterior, a excepción del fenol, el cual

se destiló y guardó en frasco ambar a 4°C hasta su utilización.

El material biológico utilizado en cada caso fue de 500 capas de aleurona de cebada (*Hordeum vulgare*, var. Himalaya). La homogenización se hizo en mortero, congelando el tejido con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se transfirió a un tubo corex de 30 ml, en donde se descongeló por la adición del amortiguador calentado a 60°C. La composición del amortiguador varió dependiendo del método utilizado para la extracción del RNA.

Los tres métodos utilizados difirieron principalmente en el tipo de sustancia utilizada como desproteinizante, de acuerdo a las cuales los nombramos métodos: del fenol, del clorhidrato de guanidina y de la proteinasa K (Tabla I). La descripción de cada uno de ellos se encuentra en las referencias.

RESULTADOS

De los métodos aquí utilizados, hemos encontrado que en cuanto a rendimiento, el método del fenol es el que proporciona mejor recuperación, seguido por el método de la proteinasa K y finalmente por el del clorhidrato de guanidina (Tabla II).

Concerniente a la pureza, medida como la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm, se encuentra una gran diferencia entre los métodos. El RNA de menor pureza es el que se obtiene por el método del clorhidrato de guanidina, mientras que el obtenido por el del fenol presenta una mejor relación. Por otra parte, el RNA obtenido por el método de la proteinasa K da una relación de absorbancias similar a la obtenida con el RNA comercial (Tabla II).

TABLA II

COMPARACION DE PUREZA, RENDIMIENTO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACIDO RIBONUCLEICO AISLADO POR DIFERENTES METODOS

Método	Pureza A ²⁶⁰ /A ²⁹⁰	Rendimiento ug RNA total ¹	Actividad ² Biológica cmp/ug RNA
Fenol	1.71	3 083 (100%)	184 220
Clorhidrato de Guanidina	1.59	1 167 (37.9%)	7 240
Proteinasa K	1.91	2 183 (70.8%)	285 464
Fenol-Proteinasa K		2 467 (80%)	735 420
RNA Comercial	2.10		

¹ RNA obtenido partiendo de 500 aleuronas.

² El sistema utilizado fue la fracción S-23 de germen de trigo preparado de acuerdo a Roberts (3). Las condiciones para la traducción fueron las reportadas en Bernal-Lugo (4).

La actividad biológica de las preparaciones de RNA, fue evaluada en un sistema de síntesis de proteínas libre de células, programado con las diferentes preparaciones de RNA. Como puede verse en la tabla II, la cantidad de desintegraciones por minuto (cpm), incorporadas difiere ampliamente en los tres métodos. El RNA obtenido por el método de la proteinasa K presenta la mayor eficiencia en la incorporación, seguido de la que se obtiene cuando el sistema es programado con la misma cantidad de RNA obtenido por el método del fenol. A diferencia de éstos, el RNA obtenido al utilizar clorhidrato de guanidina como desproteinizante carece de actividad biológica en este sistema.

El RNA obtenido por el método del fenol mejora su pureza en grado considerable al tratarse con proteinasa K y reprecipitarse con cloruro de litio aunque sólo se recupera el 80% del original. La actividad biológica del RNA obtenido con esta combinación de técnicas mejora sustancialmente.

DISCUSION

En este trabajo analizamos y comparamos tres métodos de extracción y purificación de RNA considerando tres criterios distintos. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas; el método de clorhidrato de guanidina, por ejemplo, es fácil de realizar y de bajo costo y la integridad de la molécula obtenida es semejante a la que se encuentra por los otros dos métodos (datos no mostrados)*. Sin embargo, su pureza es baja y su actividad biológica

nula, tanto en este método como en el que a continuación discutimos, existe la desventaja de que con el etanol se precipitan tanto el RNA como los carbohidratos.

El aislamiento de RNA con disolventes orgánicos fenol-cloroformo consume mayor tiempo que el anterior, pero presenta como ventaja sobre éste que desde el inicio del proceso las proteínas son extraídas en la fase orgánica, lo que disminuye la posibilidad de coprecipitación de éstas con el RNA. A esto puede deberse el mayor grado de pureza del ácido nucleico obtenido por este método, en comparación con el obtenido por el método del clorhidrato de guanidina. La calidad de esta preparación se refleja también en una mejor actividad biológica.

El RNA de mejor calidad se obtiene utilizando como agente desproteinizante una proteasa capaz de presentar actividad a altas concentraciones de detergente, con lo que se facilita la disociación de ribonucleoproteínas y la inactivación de la RNasa por hidrólisis y desnaturalización. Por otra parte, el cloruro de litio es un agente que precipita en forma selectiva al RNA y mantiene en solución a las proteínas. Sin embargo, este método resulta de alto costo para ser utilizado en forma rutinaria. No obstante se pueden obtener preparaciones de RNA de calidad similar a la que proporciona este método, si el RNA obtenido por el método del fenol se trata con proteinasa K seguido de precipitación con cloruro de litio. Esta combinación de métodos conjunta calidad y cantidad abaratando el costo.

El grado de reproducibilidad de los parámetros analizados en los tres métodos es alto, lo cual constituye una ventaja en el manejo de esta metodología. Lo anterior, aunado

* Integridad determinada por patrón electroforético.

a la poca sofisticación del equipo utilizado y a la simplicidad de los procedimientos técnicos, hace a estos métodos susceptibles de ser adaptados en un laboratorio de enseñanza a nivel licenciatura inclusive.

REFERENCIAS

1. Methods in Enzymology (1968) Vol. XII Nucleic Acids Part B. Grossman L., y Moldave K., (eds) Academic Press, New York.
2. Manual del Tercer Curso de Técnicas Básicas (1985).

Aislamiento y Purificación de Acidos Nucleicos. Departamento de Bioquímica Vegetal, DEPg., Facultad de Química, UNAM.

3. Roberts B.E., Paterson B.M., (1973) Efficient translation of tobacco Mosaic Virus RNA and Rabbit Globin 9S. RNA in a Cell Free System from Commercial Wheat Germ. Proc. Nat. Acad. Sci Vol. 70 No. 8: 2330-2334.
4. Bernal-Lugo I., (1978) Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas (Bioquímica) Facultad de Química, UNAM.

HACIA LOS CAMBIOS TRASCENDENTALES EN LA EDUCACION BIOQUIMICA

Silvia López Florez, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
Apdo. Postal 70159, 04510, México, D.F.

Para nosotros se presenta hoy como una posibilidad concreta, generar y abordar una práctica pedagógica que posibilite el nacimiento de individuos más independientes, más críticos y más creativos.

Fernández, Pablo (1)

Ante la preocupante situación por algunos problemas inherentes a nuestro sistema educativo, en el cual está inserta la enseñanza de la bioquímica como parte del currículo de la carrera de Médico Cirujano de la Facultad de Medicina de la UNAM, conviene integrar y sumar esfuerzos que conlleven a la superación de esos problemas.

En la revisión de datos proporcionados por fuentes oficiales (2), se observa que el promedio general de alumnos aprobados en la asignatura de bioquímica, durante los ciclos escolares comprendidos en los años de 1977-1984, es del 50%, lo cual revela un bajo rendimiento académico. Este hecho lamentable es por otro lado un reto para los universitarios comprometidos con la tarea de la enseñanza.

El sistema que selecciona a los alumnos para su ingreso a la UNAM, no contempla la importancia de evaluar capacidades básicas en la formación profesional tales como: pensar y razonar, cuya valoración sólo es posible con grupos reducidos y no con una población estudiantil masiva concentrada en locales como en un estadio de futbol o aun en locales más pequeños en donde los exámenes se resuelven sin el requerimiento de las capacidades referidas.

La educación planteada como un complejo sistema que posibilita el desarrollo y transformación social, no puede ni debe escapar a la evolución dentro de la cual destaca la capacidad creadora y transformadora del hombre.

Cabe aquí manifestar, por muy obvio que nos parezca, que en una sociedad tan compleja como la que vivimos a finales del siglo XX, no es posible considerar que el desarrollo del pensamiento crítico, el interés por la investigación, la preocupación transformadora y creativa, sean actitudes casuales. Su florecimiento y proliferación en general requieren de la concurrencia favorable de varios factores de tipo genético, ambiental, social y económico. Refiriéndose a este último factor y considerando que México tiene 78 000 000 de habitantes, de los cuales el 44% forma la población con edad universitaria (de 16 a 29 años) que corresponde a 34 000 000 de habitantes, solamente el 6.6% de esta última población realiza estudios universitarios, misma que está representada por 2 254 296 habitantes (3). Estos datos revelan una gran contradicción con la supuesta igualdad de oportunidades para que todos los mexicanos reciban la preparación que los capacite para enfrentar la vida con mejores expectativas en su desarrollo físico, mental y espiritual.

Evidentemente el desarrollo intelectual se propiciará en la medida en que las inquietudes se satisfagan y canalicen convenientemente, desde aquellas primeras manifestaciones del niño, cuando empieza a indagar a través del: ¿qué es?, ¿para qué? en relación con el universo que lo rodea.

No es nuestro propósito en este espacio, el presentar un análisis de las etapas que anteceden a la formación del estudiante universitario, sin embargo se quiere resaltar e insistir en que la educación familiar, preescolar, primaria, media y media superior, son fundamentales en la conformación de la estructura cognoscitiva e integral del individuo.

El planteamiento anterior no debe servir como justificación ni conformismo ante ciertos fracasos de la enseñanza superior, tampoco debe usarse como pretexto para que el profesor universitario no haga el mejor esfuerzo por ayudar a remediar esta situación y contemplar en esa información una llamada de atención que determine la superación de los problemas de la enseñanza. No es posible seguir perpetuando sistemas educativos en nombre del condicionamiento y la costumbre. Es digno, por lo tanto, considerar el estudio de las acciones realizadas a la fecha en la preparación de los maestros que tienen a su cargo el desempeño de una función tan amplia, delicada e importante, a fin de promover los cambios que garanticen la efectividad del sistema educativo a nivel nacional, para propiciar el desarrollo de las capacidades, habilidades y destrezas del ser humano.

La enseñanza superior debe ser ejemplo y semillero de maestros que promuevan modificaciones idóneas en la educación a todos los niveles y en las diferentes áreas. Esta iniciativa debería provenir del personal académico de la UNAM y a la postre redituara a favor de su desarrollo y grandeza cuya trascendencia obviamente tendrá alcances a nivel nacional. De lo contrario continuaremos en este círculo vicioso, en el que se pretende elevar el nivel académico en la preparación del estudiante universitario, pero dado que sus bases académicas anteriores en general son deficientes no se puede lograr satisfactoriamente el objetivo que inicialmente se propone.

Con cierta frecuencia los profesores se quejan de sus alumnos por ingresar a la UNAM, con un nivel académico bajo, así como con carencias en su desarrollo intelectual. Sin embargo "no debemos negar ni confirmar" que este hecho constituya el principal problema del bajo rendimiento académico que se obtiene, primero deberán generarse trabajos de investigación cuyo enfoque científico permita el análisis de todos y cada uno de los factores, elementos y componentes que inciden en el proceso de enseñanza-aprendizaje y así poder discriminar y jerarquizar cada uno de los problemas con objeto de resolverlos.

En la renovación educativa centrada en la mayoría de los casos en la modificación de los planes de estudio, en la

construcción de nuevos edificios, en los nuevos profesores que practican nuevas técnicas en el acto de la enseñanza, se observa sin embargo que los esfuerzos realizados "no han modificado" substancialmente la situación.

Son muchos los problemas y hechos concretos que revelan la necesidad de orientar la búsqueda por el camino que permita encontrar soluciones que realmente mejoren el proceso educativo de la enseñanza superior, ya que a pesar de que en la UNAM se cuenta con instituciones para la preparación especializada del docente, se observan problemas como los siguientes:

1. Algunas personas egresadas del grado de especialización o maestría en enseñanza superior, encuentran un campo muy limitado para desarrollar trabajos de investigación educativa en las instituciones donde desempeñan ciertas actividades docentes.

2. En cada institución encargada de la preparación profesional en la docencia, se brinda un enfoque y objetivos diferentes, por lo cual los esfuerzos se dispersan y no siempre coinciden a favor de la solución de los problemas de la enseñanza, que de acuerdo con los estatutos de la UNAM son prioritarios.

La vía que conlleva a la superación y actualización de la docencia es a través de:

- el dominio y actualización de la materia que se imparte
- el desarrollo y aplicación de métodos de enseñanza que promuevan aprendizajes significativos en donde el alumno investiga, confronta, analiza, concluye y enriquece su criterio, bajo la coordinación y guía autorizada del profesor, desmitificando así la idea del profesor como personaje omnisapiente
- el conocimiento sobre teoría curricular que posibilite la integración del profesor a los grupos encargados de revisar y reestructurar programas y planes de estudio.
- el conocimiento individual de los alumnos, (cuando los grupos son reducidos)
- el conocimiento y coordinación adecuada de los grupos, así como la dinámica que en forma particular presenta cada uno de ellos
- la constatación de los aprendizajes logrados por los alumnos
- el desarrollo de proyectos de investigación para mejorar todos y cada uno de los aspectos arriba mencionados, subrayando la importancia de considerar su valoración sistemática como un proceso de evaluación

Por lo tanto, la práctica profesional de la docencia contempla las etapas generales del acto de la enseñanza: planeación, ejecución y evaluación, no como simples pasos secuenciales, ya que cada una representa un subsistema dentro del proceso de enseñanza-aprendizaje, por lo cual su estudio y perfeccionamiento implican un permanente trabajo de investigación que responda a la *necesidad de elaborar un proyecto racional que brinde la fundamentación válida al proponer alternativas en la toma de decisiones, sobre la elaboración de los currícula.*

Para superar debidamente algunas de las carencias referidas se requiere la participación y compromiso de personal calificado, así como el apoyo de las autoridades universitarias a fin de incrementar la investigación educativa en la UNAM, misma que por su magnitud e importancia merece especial cuidado, no sólo a nivel de facultad sino *muy particularmente en cada departamento educativo*, ya que ambos enfoques no son excluyentes entre sí, sino deben ser el reflejo de la continuidad, complementación y progreso educativo.

En tanto no se aborde la enseñanza con calidad y profesionalismo que demanda, seguiremos presenciando, por desgracia con cierta frecuencia, los trabajos que con gran esfuerzo realiza un grupo de profesores asesorados por especialistas en docencia con objeto de diseñar algún modelo de enseñanza, mismo que sin probarse previamente en el aula, se propone en algún evento académico a nivel nacional, después se abandona o en el mejor de los casos se prueba una sola vez, sin agotar su estudio y mejoramiento, y se archiva sin cubrir el objetivo principal para el cual fue elaborado, que es el de mejorar la enseñanza superior.

Refiriéndonos al párrafo anterior consideramos que sólo a través de proyectos creados a partir de nuestros propios problemas y para la solución de los mismos, podremos contribuir a la renovación y transformación real del quehacer educativo y como lógica consecuencia superar el nivel académico de nuestra Universidad. Cabe mencionar que el método científico constituye parte de la valiosa herramienta que posibilita la investigación educativa.

En relación con algunos documentos oficiales para la planeación de la enseñanza, conviene destacar que el diseño y elaboración de programas y planes de estudio, no tiene razón ni sentido sin la incorporación de los alumnos. Son ellos quienes podrán aportar a corto, mediano y largo plazo, la información válida que ayude a ampliar los criterios para la toma de decisiones en la estructura de dichos documentos. Se considera por lo tanto de fundamental importancia la participación de los estudiantes, desde los que se inician hasta los que están por concluir la carrera universitaria, ya que estos últimos poseen mayor experiencia y sus actividades están más estrechamente vinculadas a su ejercicio profesional.

El reciente surgimiento de la investigación educativa en nuestro ámbito de trabajo, precisa entre otras, la necesidad de su confrontación en el aula. En este sentido podremos incidir en la etapa de la ejecución de la enseñanza, misma que presenta ciertos obstáculos pero al mismo tiempo brinda la oportunidad y privilegio de la interacción alumno-profesor, por consiguiente vale la pena profundizar en su estudio, invertir tiempo, trabajo, dedicación y esfuerzo, a fin de promover cambios no sólo en términos cuantitativos sino también cualitativos.

A través de la experiencia docente y de una amplia revisión de literatura reconocida y actualizar en materia educativa, se tienen datos que permiten constatar, que el rendimiento académico se eleva en la medida que el profesor mejora su preparación y actualización profesional como docente, siempre y cuando asuma la responsabilidad que como profesor universitario le corresponde.

Por supuesto que todo esto prevé la necesidad de contar con grupos reducidos, ya que cuando éstos son mayores de veinte alumnos, se sacrifican muchas posibilidades pedagógicas por lo cual se afecta el proceso de enseñanza-aprendizaje y disminuye su rendimiento académico.

El aprendizaje de los contenidos del curso de bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, implica cierto grado de dificultad de acuerdo a los antecedentes académicos del alumno. La tarea del profesor debe consistir en promover las acciones que propicien dicho aprendizaje, para lo cual es necesario disponer del tiempo razonable y no distraer la atención del profesor con una serie de actividades que aun siendo importantes, no se pueden atender sin sacrificar el trabajo docente ante el grupo.

Se debe contar con grupos reducidos, para mejorar la comunicación y conocimiento de nuestros alumnos. Reforzar en el estudiante actitudes de responsabilidad, interés, compromiso, espíritu crítico y reflexivo. Sugerir métodos de estudio que posibiliten una mayor comprensión y análisis de los contenidos, para ello la línea pedagógica que se propone, centra su atención en el alumno a fin de superar ciertas deficiencias preestablecidas en la enseñanza y promover una mayor actividad mental del estudiante, elevando por consiguiente el nivel del aprendizaje de los contenidos.

Es necesario propiciar durante la enseñanza la participación del alumno, para que él mismo ponga en duda la verdad que se le plantea, para que pueda concebirla como verdad relativa y no absoluta. Donde el estudiante abandone la actitud receptiva, pasiva y contemplativa.

De acuerdo con Hilda Taba (4):

- No se puede concebir que el dominio pasivo del contenido pueda producir una mente disciplinada y una actitud científica ante la investigación.

- El aprendizaje es el resultado de la interacción entre el contenido y los procesos mentales del estudiante.
- Los conceptos tienen valor educativo, en tanto que el alumno pueda hacer con ellos algo más que su definición verbal.

La evaluación del proceso de enseñanza-aprendizaje en sus diferentes etapas, debe contemplar todos y cada uno de sus elementos y componentes involucrados, sin perder de vista la integración del alumno como sujeto responsable y crítico de su propio aprendizaje. El desarrollo sistemático de éste trabajo cuando el mismo profesor toma la iniciativa y se compromete, ofrece muchas bondades, entre otras la de reafirmar tanto al alumno como al maestro dentro de la superación del proceso educativo. Para este propósito los trabajos de seguimiento en la formación profesional del médico como parte de la investigación educativa, representan una fuente de información valiosa, la cual deberá recabarse sistemáticamente en el momento oportuno para propiciar la espontaneidad, seriedad y compromiso de los participantes. En el escenario de esta obra el alumno no se sentirá defraudado porque él mismo será testigo de que su actitud comprometida tiene trascendencia en la superación de algunos problemas de la enseñanza.

El alumno también tiene elementos que brindar para enriquecer el conocimiento y experiencia del profesor. Esta posibilidad aumenta cuando el profesor ha fortalecido su capacidad creativa, misma que será de mayor relevancia al proyectar ante sus alumnos la inquietud por la investigación básica educativa.

El profesor adquiere funciones de orientador al brindar alternativas a los alumnos, por lo que resulta incongruente reducir la profesionalización del docente, al dominio de su materia y al conocimiento de elementos instrumentales de la docencia. El profesor deberá difundir y generar el conocimiento, como herramienta necesaria en la búsqueda del nuevo conocimiento, que permita desarrollar el criterio del alumno a favor de la solución de los problemas en el área de la salud, al referirnos a la formación profesional del médico.

Concluimos en términos generales que, para abordar y resolver algunos problemas de la enseñanza superior, se

requiere la profesionalización y actualización de la docencia, misma que lleva implícita la práctica de la investigación educativa y donde cobra gran importancia la participación activa y efectiva del alumno como elemento integrante del proceso de enseñanza-aprendizaje, que permita consolidar su desarrollo tanto intelectual como afectivo. Todo lo cual necesariamente debe contar con el apoyo y reconocimiento de las autoridades universitarias.

Por último aunque no menos importante, debemos pugnar no sólo por el desarrollo de las capacidades intelectuales del profesional de la medicina, sino también por aquellas que lo califiquen con una elevada ética profesional y una gran calidad humana, que le permita demostrar el respeto por la persona enferma así como el compromiso por ayudarla y protegerla, tal es la mínima retribución que se puede dar a la sociedad que ha hecho posible su formación, aspecto que por ser tan común en nuestro medio, con frecuencia se ve olvidado.

"Nadie enseña a nadie, todos aprendemos de todos" (5).

REFERENCIAS

1. FERNANDEZ, PABLO. (1981) "Continuidad y ruptura del planteamiento metodológico: notas críticas para su análisis", en Revista foro 2 universitario; México, UNAM-STUNAM. 35-42
2. Informe anual de rendimiento académico del primero y segundo semestre, desde 1977 a 1984. Coordinación de Enseñanza, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
3. SALDAÑA DE DELGADILLO YOLANDA. (1984) "El papel de los investigadores en la formación de profesionistas dedicados a la docencia de la Bioquímica en el país", Boletín de Educación Bioquímica BEB, III, No. 4, Facultad de Medicina, U.N.A.M. 22-26.
4. TABA HILDA, (1974). "Elaboración del currículo teoría y práctica." Editorial Troquel, Argentina, 662 págs.
5. PAULO FREIRE, (1976) "Pedagogía del oprimido", Editorial Siglo Veintiuno Editores, 15a. edición p 70-95.

FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION Y SUS APLICACIONES EN BIOMEDICINA

Antonio Liras Martín, Profesor Ayudante, Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. U.A.M. Arzobispo Morcillo, 4. 28029 Madrid. España.

INTRODUCCION

La investigación biomédica en las últimas décadas, está alcanzando muy altas cotas. Esta circunstancia se debe,

primordialmente, a los grandes avances que se están produciendo en lo que a desarrollo de técnicas y métodos analíticos aplicados a la bioquímica se refiere, tanto en investigación básica como aplicada.

La cromatografía líquida, en sus distintas formas, ya sea como técnica analítica o preparativa, ha constituido en los últimos años, una de las técnicas más refinadas, precisas y de mayor aplicación en un laboratorio, no sólo de bioquímica, sino también en otros campos de investigación, como pueden ser la farmacología o la toxicología.

La cromatografía tradicional ya sea sobre capa fina, papel, cambio iónico o exclusión, no resulta práctica para la resolución de algunos problemas concretos, pues presenta dos inconvenientes: una menor eficacia en la separación y largos tiempos de análisis. La aparición de la cromatografía líquida que sigue las bases teóricas de la cromatografía de gases, ya en 1967 gracias a los trabajos de Huber y Hulsman, supuso grandes ventajas sobre los distintos tipos de cromatografía clásica y sobre la cromatografía de gases en lo que a eficacia de columna y velocidad de análisis se refiere.

La "nueva" cromatografía líquida se conoce bajo distintas denominaciones: HSLC o cromatografía líquida de alta velocidad; HELC, CLAE o cromatografía líquida de alta eficacia y HPLC, nombre más aceptado actualmente, o cromatografía líquida de alta presión o alto rendimiento.

En términos generales, el gran costo del equipo para HPLC, especialmente los rellenos de columnas y fases móviles, hace que la cromatografía de gases no sea desplazada en algunos laboratorios por la cromatografía líquida de alta presión. Sin embargo existe un gran número de compuestos orgánicos demasiado inestables o poco volátiles para ser procesados por cromatografía de gases sin que sufran modificación química. Estas circunstancias, así como la menor recuperación cuantitativa que se obtiene en otros tipos de cromatografía, hacen que la cromatografía líquida de alta presión se haya convertido en la técnica analítica y preparativa más adecuada para estos y otros compuestos.

Así pues, podemos resumir las ventajas de la HPLC en: Una alta resolución; gran reproducibilidad; tiempos de análisis generalmente más cortos; técnica analítica y preparativa; las columnas se pueden utilizar varias veces sin regeneración (Hamilton y Sewell, 1981).

MODOS DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

La separación en cromatografía líquida de alta presión se puede llevar a cabo a través de distintas formas o modos de cromatografía, basados fundamentalmente en los distintos tipos de solventes (fase móvil) y en las distintas resinas poliméricas (fase estacionaria).

La cromatografía líquido-líquido se basa en la separación de compuestos por su distinta distribución en una fase móvil líquida y en otra fase estacionaria líquida de

acuerdo con sus distintos coeficientes de reparto que se traduce en una distinta relación de migración.

Las fases estacionarias se preparan actualmente a partir de partículas esféricas de sílice de muy pequeño diámetro, haciendo reaccionar los grupos silanol con un organoclorosilano o un alcoxisilano, para obtener una unión del tipo Si-O-Si-R que es muy estable, y donde el grupo R puede ser un agrupamiento hidrocarbonado de 8 ó 18 carbonos, o bien una cadena hidrocarbonada a la que se ha unido, en su extremo, un grupo polar como $-\text{CN}$ ó $-\text{NH}_2$. De aquí se deriva la posibilidad de tener grupos con carácter polar y grupos con carácter apolar que condicionan las características de la zona que constituye la fase líquida estacionaria.

El término de cromatografía líquido-líquido en *fase normal* se refería, originariamente, al sistema de separación formado por una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, como hexano o benceno. Si por el contrario, la fase estacionaria era no polar y la fase móvil era polar (agua) se hablaba de cromatografía líquido-líquido en *fase reversa*. Actualmente se define como fase normal al sistema formado por una fase estacionaria más polar que la fase móvil y cromatografía líquido-líquido en fase reversa cuando la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Así la HPLC en fase normal se podría utilizar preferentemente, sin establecer normas rígidas, para la separación de compuestos polares y en fase reversa para la separación de compuestos más hidrofóbicos.

Se habla, pues, en términos relativos; así, en fase normal, la polaridad de la resina o relleno sería alta mientras que en fase reversa sería baja. En cuanto a la polaridad del solvente utilizado en fase normal sería de baja a media y en fase reversa de media alta, siendo, por tanto, el orden de elución en fase normal primero los compuestos menos polares y en fase reversa primero los más polares. Por otra parte, el efecto del incremento de la polaridad del solvente se traduciría en la reducción del tiempo de elución para fase normal y un incremento del tiempo de cromatograma en el caso de utilizar fase reversa.

Se nos brinda, por tanto, un amplio abanico de posibilidades de trabajo, aprovechando, por otro lado, las nuevas técnicas de par iónico (PIC) como un modo especial de cromatografía líquido-líquido usado para la separación de compuestos iónicos o ionizables que no poseen suficiente carácter lipófilo para ser retenidos, ya que lo más habitual es que apliquemos el PIC en fase reversa. Consiste en adicionar a la fase móvil un agente, por ejemplo, tetrabutamonio, que forma un par iónico con el compuesto a separar, aumentando su lipofilia y, por tanto, la afinidad por la fase estacionaria.

Existen otros modos de cromatografía, quizás menos utilizados, como son la *cromatografía líquido-sólido* basada en la adsorción, en una fase estacionaria sólida, de las

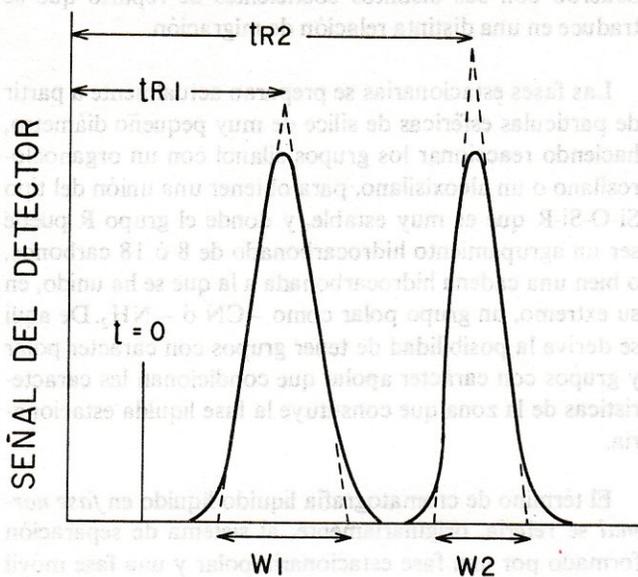


Figura 1. Separación cromatográfica de dos componentes de una mezcla donde t_R representa el tiempo de retención y W la anchura del pico cromatográfico en la línea base.

moléculas presentes en la muestra, que se encuentran en la fase móvil líquida; **cromatografía de cambio iónico** cuya fase estacionaria consiste en una matriz rígida en la cual su superficie presenta puntos de anclaje cargados positiva o negativamente; **cromatografía de exclusión** o gel filtración, basada en la separación en función del peso molecular.

La elección del modo cromatográfico adecuado en función de nuestras necesidades, combinando otras condiciones de trabajo como pueden ser, pH de la fase móvil o tipo de elución, isocrática o utilizando gradiente, hace que el rendimiento en esta técnica sea muy satisfactorio.

CONCEPTOS CROMATOGRAFICOS TEORICOS

Toda separación cromatográfica de uno o más componentes presentes en una mezcla, se basa en las diferencias en el coeficiente de distribución de dichas sustancias entre dos fases, fase estacionaria y fase móvil. El coeficiente de distribución se define como $K = (C)_e / (C)_m$, es decir, el cociente entre la concentración del componente en la fase estacionaria y su concentración en la fase móvil. La migración es, por tanto, inversamente proporcional al coeficiente de distribución; un incremento en K supone una mayor concentración del compuesto en la fase estacionaria y por tanto la migración será menor.

Retención cromatográfica

La retención cromatográfica se define como la razón entre la distancia recorrida por la banda correspondiente a la muestra y la recorrida por el frente correspondiente a la fase móvil.

Se denomina tiempo de retención (t_R) para un compuesto determinado (Figura 1), al tiempo de elución

en un cromatograma, medido a partir del momento cero o señal de inyección de la muestra, hasta el momento de elución del máximo del pico correspondiente a esa sustancia. El volumen de retención será, por tanto, el resultado del producto flujo de bomba en mililitros en la unidad de tiempo, por el tiempo de retención.

En cromatografía líquida de alta presión la fase móvil se considera incapaz de comprimirse, y la presión y el flujo de bomba constantes a lo largo de la columna cromatográfica, por tanto, la retención no se ve alterada. Sin embargo, si se modifica por la concentración de muestra inyectada. Si esta concentración es suficientemente alta se puede alterar la simetría de la curva gaussiana, ya que se rompe la linealidad entre la concentración del compuesto a separar en la fase estacionaria y su concentración en la fase móvil.

Otra alteración en el pico cromatográfico que podemos observar y que está directamente relacionada con la retención, es el ensanchamiento del pico, debido fundamentalmente a tres efectos: difusión de Eddy, que se produce en los poros de las partículas en que la fase móvil se mueve más despacio; difusión molecular en la interfase (zona entre fase estacionaria y fase móvil) y transferencia de masa o proporción en la cual el soluto se transfiere fuera y dentro de la fase estacionaria, o de la fase móvil.

Eficacia o número de "platos" teóricos

Se define el número de "platos" teóricos, N , como el número de etapas de equilibrio a lo largo de la columna cromatográfica. Este valor de eficacia viene establecido por la expresión $N = 16 (t_R / W)^2$, donde t_R representa el tiempo de retención y W la anchura de pico medida en línea base. Se puede definir también la altura equivalente de un "pla-

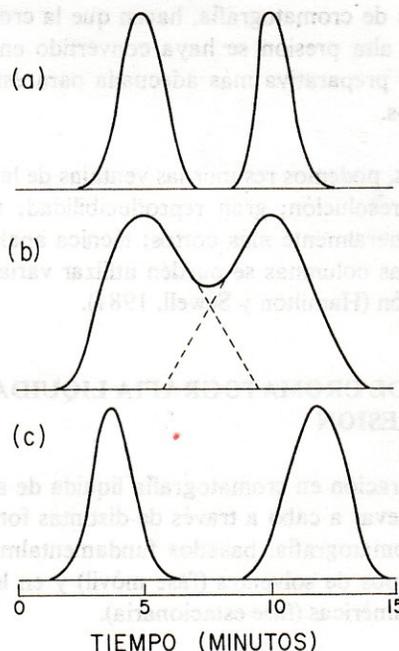


FIGURA 2. Estudio de la resolución cromatográfica en función del tiempo de retención y anchura de pico.

to" teórico o valor del "plato", que se representa por H y que expresa el cociente entre la longitud de la columna y el número de "platos" teóricos.

La eficacia es uno de los más importantes conceptos en cromatografía líquida de alta presión, y que debe ser controlada en cada columna para conocer en todo momento la integridad en la compactación del relleno. La eficacia está relacionada con el diámetro de partícula de tal forma que una disminución en el tamaño de partícula utilizada (en HPLC puede ser de 1 ó 3 μm) supone un gran incremento en la eficacia cromatográfica.

Resolución cromatográfica

La separación de dos componentes en una cromatografía, está definida por el concepto de resolución. Dos sustancias se obtendrán resueltas en un cromatograma cuando exista una diferencia apreciable en sus relaciones de migración. El valor matemático de la resolución (R_s) está dado por la expresión: $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$, es decir, un aumento en la diferencia de los tiempos de retención y una disminución en la anchura de los picos, significan un aumento en la resolución.

La resolución depende de la relación existente entre efi-

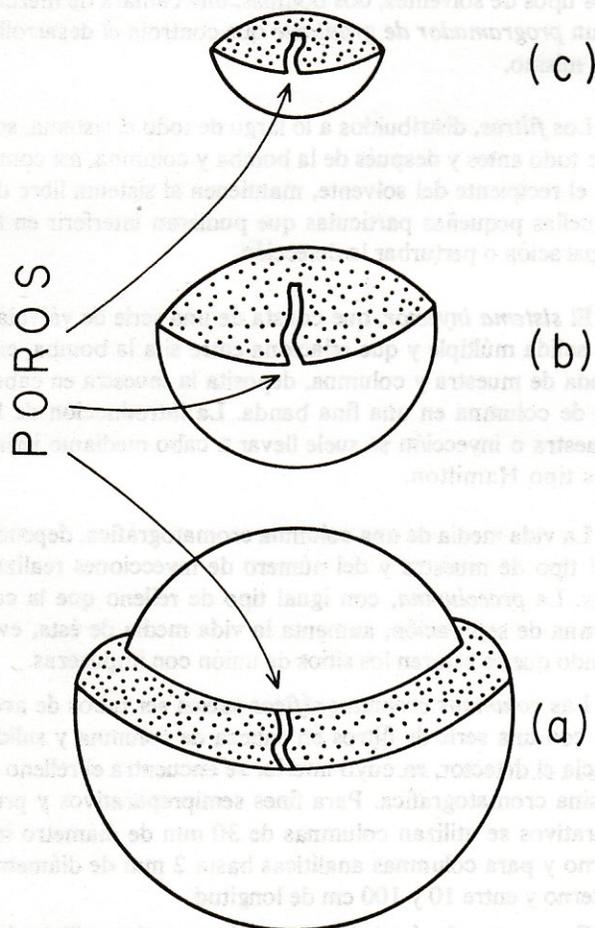


FIGURA 3. Tipos de partículas de relleno cromatográfico. a) "Perlas" peliculares (30a 45 μm); b) Partículas microporosas (20a 40 μm) con poros profundos; c) Partículas microporosas (3a 10 μm) con poros cortos.

cia del solvente, es decir, una buena separación de picos y eficacia de columna que se traduce en una menor anchura de pico. En la figura 2a se representa un caso óptimo de separación de dos componentes; en la figura 2b, aunque la separación es la misma, la anchura de pico es mayor y por tanto, la resolución se ve disminuida; en la figura 2c se observa una pobre eficacia de columna ya que existe una gran anchura de pico, y una mejor eficacia del solvente que se traduce en una buena resolución a costa, sin embargo, de un aumento en el tiempo de retención para el segundo de los componentes, y por otra parte, un aumento de la dilución de pico. En cromatografía líquida de alta presión se llega, con mucha frecuencia, a tener que tomar una decisión de transacción a la hora de conseguir una buena resolución en el menor tiempo posible de elución.

FASES ESTACIONARIAS Y FASES MOVILES

A diferencia de las columnas clásicas de cromatografía en que el tamaño de partícula de la fase estacionaria es de más de 100 μm , en cromatografía líquida de alta resolución el tamaño es de unos 10 nm. Esto hace que los efectos de difusión se vean disminuidos. Por otra parte, la elaboración más depurada de la forma de estas partículas en lo que a geometría esférica y a superficie se refiere, hacen que la eficacia en una separación, haciendo uso de esta técnica, sea varias veces superior a la eficacia en cromatografías convencionales.

Existen dos tipos fundamentales de partículas de relleno: "perlas" o "cuentas" peliculares y partículas microporosas (figura 3). Las "perlas" peliculares están constituidas por un núcleo no poroso inerte, generalmente de sílice, rodeado de una fina cubierta porosa que puede ser de sílice o de resina cambiadora de iones. Este tipo de partícula aunque tiene la ventaja de poderse empaquetar en seco dentro de la columna, tiene poca capacidad debido a que los poros son muy cortos por lo que no es el tipo más adecuado de partícula para cromatografía preparativa. Por el contrario, las partículas microporosas, primero de 20 a 40 μm y recientemente de 3 a 10 μm , con gran superficie por gramo de resina, son difíciles de empaquetar en seco debido a la aglomeración de partículas por atracción electrostática pero, sin embargo, tienen una gran capacidad.

En cuanto a las fases móviles o solventes de elución, hay que tener presente su calidad y pureza, inmiscibilidad y no reactividad con la fase estacionaria, baja viscosidad y el costo económico, está condicionada la elección del solvente a la fase estacionaria que se esté utilizando. Los solventes elegidos según estos criterios, se han de purificar tanto de partículas extrañas como de bacterias, ya sea por filtración o bien por destilación.

En fase reversa, con rellenos de C_{18} ó C_8 se suelen utilizar mezclas como metanol-agua o acetonitrilo-agua. En fase normal con rellenos de sílice modificada con grupos funcionales de amino o nitrilo, se utilizan solventes más polares como fosfato amónico o fosfato potásico. En general, se pueden utilizar mezclas de solventes como fase móvil, modificando las condiciones de la mezcla en cuanto a

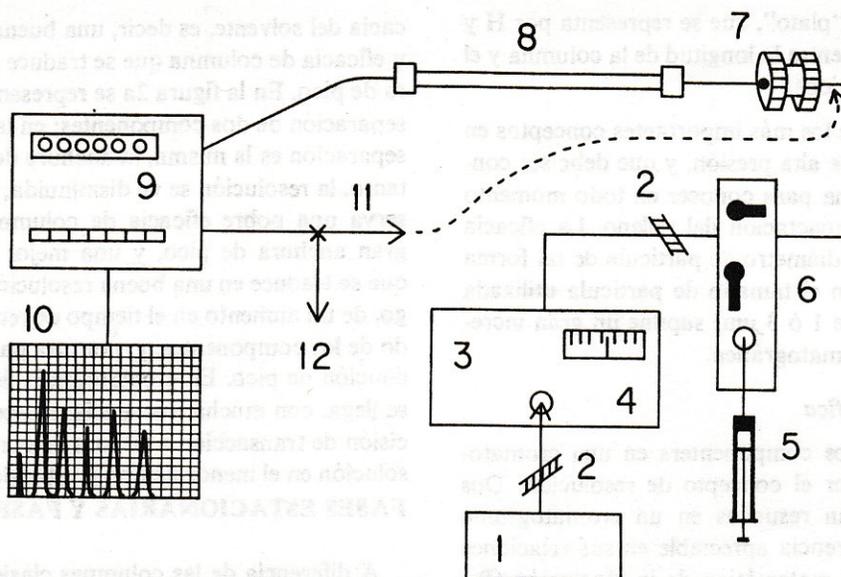


Figura 4. Representación esquemática de un equipo para cromatografía líquida de alta resolución. 1) Recipiente para el solvente; 2) Filtros; 3) Bomba; 4) Control de presión; 5) Jeringa de muestra; 6) Sistema inyector; 7) Precolumna; 8) Columna; 9) Detector; 10) Registro; 11) Salida de reciclaje; 12) Salida a colector de fracciones.

pH y concentración se refiere, así como hacer uso de una elución isocrática o una elución en forma de gradiente.

EQUIPO INSTRUMENTAL

El pequeño tamaño de partícula del relleno cromatográfico supone la aplicación de presiones superiores a la gravitacional y un control más preciso, por tanto, del flujo de la bomba. Esta circunstancia se traduce en la necesidad de disponer de un equipo sumamente preciso y seguro.

Un sistema sencillo de HPLC consiste, como se muestra en la figura 4, de: recipiente para el solvente, bomba de control de flujo y presión, sistema inyector, precolumna, columna cromatográfica, sistema detector y registro.

Los recipientes para solvente deben ser de un material que no libere elementos, sobre todo metálicos, que puedan perturbar la separación; los más indicados son los de vidrio. Es importante la preparación de los solventes. El producto utilizado debe ser de alto porcentaje en pureza, de preferencia "grado HPLC". La disolución se ha de preparar con agua bidestilada lo más pura posible realizando posteriormente el desgasificado, por filtración a vacío, del solvente preparado. En este proceso se elimina el oxígeno disuelto y se evitan así dos problemas, de una parte, la entrada de aire en la bomba que hace disminuir la presión, y por tanto el flujo deja de estar controlado, y por otra parte, la aparición de microburbujas en el detector que se traduce en la aparición de picos "fantasma" en el cromatograma.

El sistema de bomba es un componente crítico en un cromatógrafo de alta presión y su desarrollo en la última década ha decidido el avance de la HPLC. Actualmente los sistemas de bomba más precisos son los constituidos por doble pistón, evitando así, los pulsos de bombeo, haciendo más preciso el flujo y manteniendo una buena línea

base.

A veces para un problema en concreto, se precisa la utilización de elución en gradiente; en estos casos se precisan dos tipos de solventes, dos bombas, una cámara de mezcla y un programador de gradiente que controla el desarrollo del mismo.

Los filtros, distribuidos a lo largo de todo el sistema, sobre todo antes y después de la bomba y columna, así como en el recipiente del solvente, mantienen al sistema libre de aquellas pequeñas partículas que pudieran interferir en la separación o perturbar la detección.

El sistema inyector, que consta de una serie de válvulas de salida múltiple y que relaciona entre sí a la bomba, entrada de muestra y columna, deposita la muestra en cabeza de columna en una fina banda. La introducción de la muestra o inyección se suele llevar a cabo mediante jeringas tipo Hamilton.

La vida media de una columna cromatográfica, depende del tipo de muestra y del número de inyecciones realizadas. La precolumna, con igual tipo de relleno que la columna de separación, aumenta la vida media de ésta, evitando que se saturan los sitios de unión con impurezas.

Las columnas cromatográficas suelen ser tubos de acero con una serie de filtros en cabeza de columna y salida hacia el detector, en cuyo interior se encuentra el relleno o resina cromatográfica. Para fines semipreparativos y preparativos se utilizan columnas de 30 mm de diámetro interno y para columnas analíticas hasta 2 mm de diámetro interno y entre 10 y 100 cm de longitud.

En cuanto a la detección de señal, se pueden utilizar dos tipos básicos de detectores, aquellos que miden una propiedad común a la muestra y a la fase móvil, como pueden

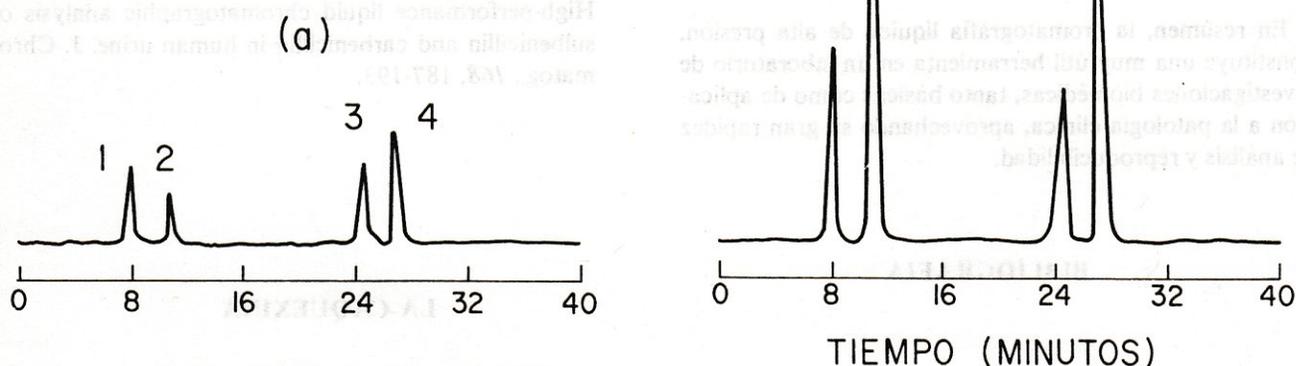


Figura 5. Análisis de porfirinas por HPLC en orina de sujetos normales (a) y pacientes con porfiria intermitente aguda (b). (tomada de Lim y Peters, 1984).

ser los detectores refractométricos, conductimétricos y dieléctricos, o aquellos en que se mide una propiedad específica para la muestra como son los detectores ultravioleta (U.V.), polarográfico y radioactivo.

Los detectores, en general, deben poseer un bajo límite de detección, es decir, poder detectar hasta concentraciones traza, una alta sensibilidad y disponer de células de geometría característica, que eliminan la absorción debida a cambios en el índice de refracción, y de pequeñas dimensiones para disminuir el efecto dilución. El límite de detección, en general, para los detectores más utilizados, U.V. y refractométrico, que se basa en la medida de diferencias de índice de refracción entre la fase móvil pura y en presencia de muestra, son, respectivamente, de 1 nanogramo de soluto y de 1 ppm de muestra en el eluyente que equivale a 10^{-7} unidades de índice de refracción.

APLICACIONES EN BIOMEDICINA

La aplicación de la cromatografía líquida de alta presión alcanza a numerosas ramas de investigación, tanto básica como aplicada, tales como química inorgánica, procesos industriales, estudios y control de contaminación y biomedicina.

La investigación biomédica ha sido la que más se ha beneficiado de las ventajas que la cromatografía líquida de alta presión nos ofrece. Farmacología, toxicología y bioquímica son los campos biomédicos que más han aplicado a problemas de índole diversa las posibilidades que brinda la HPLC. La farmacología y toxicología han abordado estudios, por ejemplo, sobre alcaloides, drogas, antibióticos, analgésicos o esteroides; por otra parte, se han desarrollado estudios bioquímicos de separación y cuantificación de aminoácidos, azúcares, lípidos, componentes de ácidos nucleicos e incluso estudios de actividades enzimáticas

mediante el aislamiento de los productos obtenidos en la reacción enzimática.

Multitud de trabajos sobre la aplicación de HPLC en biomedicina aparecen frecuentemente en la bibliografía. Citaré aquí, algunos ejemplos ilustrativos del gran auge que presenta esta técnica actualmente. Así, las partículas del gel microparticulado se están utilizando para la separación de alcaloides (Perchalski, y cols. 1975). Las columnas en fase reversa con resinas compuestas de sílice a las que se han unido cadenas de C_{18} , es decir, resinas de octadecilsilano, se empiezan a utilizar actualmente con bastante éxito. Se están aplicando a la separación de antibióticos (Yamaoka, y col. 1979), o estudios de componentes de ácidos nucleicos, bases, nucleósidos o nucleótidos (Orityd y Schrader 1984), utilizando detección ultravioleta a 254 nm, y de derivados de aminoácidos (Radjai y Hatch, 1980).

Las resinas de intercambio iónico en fase normal, es decir, partículas de sílice con cadenas de C_{18} ó C_8 a las que se han unido grupos iónicos, se están utilizando, por ejemplo, para la separación de analgésicos (Masoud y col, 1978), azúcares (van Olst y Joosten 1979), utilizando detección refractométrica, o compuestos antidepresivos (Vermeulen y Thompson 1984), utilizando detector de fluorescencia.

La cromatografía líquida de alta presión se utiliza por su rapidez, poder de resolución y sensibilidad, para el estudio de patologías clínicas. En este sentido se han estudiado recientemente (Lim y Peters, 1984) las anomalías en el metabolismo de porfirinas. En este caso se utilizó fase reversa en gradiente. En la figura 5a, se muestra el perfil cromatográfico en HPLC de orina de un sujeto normal en el que los picos 1 y 2, que eluyen aproximadamente entre los 8 y 10 minutos, corresponden a uroporfirina I y uroporfirina III respectivamente. Los picos 3 y 4 aproximadamente

entre 24 y 27 minutos corresponden a coproporfirina I y coproporfirina III. Si se procesa una muestra de orina procedente de un paciente con porfirina intermitente aguda, (Figura 5b), en iguales condiciones, vemos que, a iguales tiempos de elución se encuentran aumentados los picos correspondientes a las uroporfirinas y coproporfirinas.

En resumen, la cromatografía líquida de alta presión, constituye una muy útil herramienta en un laboratorio de investigaciones biomédicas, tanto básicas como de aplicación a la patología clínica, aprovechando su gran rapidez de análisis y reproducibilidad.

BIBLIOGRAFIA

- Hamilton, R.J. y Sewell, P.A. (1981). Introduction to high performance liquid chromatography. Editorial Chapman and Hall.
- Huber, J.F.K. y Hulsman, Y.A.R.J. (1967). A study of liquid chromatography in columns. The time of separation. *Anal. Chim. Acta*, 38, 305-313.
- Lim, C.K. y Peters, T.J. (1984). Urine and faecal porphyrin profiles by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the porphyrias. *Clin. Chim. Acta*, 139 (1), 55-63.
- Masoud, A.N., Scratchley, G.A., Stohs, S.J. y Wingard, D.M. (1978). Simultaneous determination of lidocaine (Lignocaine) and thiopental in plasma using high pressure-liquid chromatography. *J. Liq. Chromatog.*, 1, 607-616.
- Ontyd, J. y Schrader, J. (1984). Measurement of adenosine, inosine and hypoxanthine in human plasma. *J. Chromatog.*, 307, 404-409.
- Perchalski, R.J., Winefordner, J.D. y Wilder, B.J. (1975). Evaluation of Eimac Lamp as excitation source for molecular fluorescence with application to quantitation of ergotamine in plasma by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Chem.* 47, 1993-1999.
- Radjai, M.K. y Hatch, R.T. (1980). Fast determination of free amino acids by ion-pair high-performance liquid chromatography using on-line post-column derivatization. *J. Chromatog.*, 196, 319-322.
- Van Olst, H. y Joosten, G.E.H. (1979). Analysis of mixtures of glucose, fructose and mannose by HPLC. *J. Liq. Chromatog.*, 2, 111-116.

Vermeulen, J.D. y Thompson, T.A. (1984). Assay for the determination of the tetracyclic antidepressant compound aptazapine in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog.*, 306, 412-416.

Yamaoka, K., Narita, S., Nakagawa, T. y Uno, T. (1979). High-performance liquid chromatographic analysis of sulbenicillin and carbenicillin in human urine. *J. Chromatog.*, 168, 187-193.

LA CAQUEXINA

(*Sci. Am.*, 253: (5) 66-68 (1985) Nov.)

La caquexia es un síndrome que afecta frecuentemente a individuos enfermos de cáncer o de una infección grave. Aún cuando dichos pacientes se alimenten con una dieta adecuada, experimentan una pérdida de peso continua. La causa del síndrome, parece ser la caquexina, una proteína parecida a una hormona que producen los macrófagos, uno de los tipos principales de las células del sistema inmunológico.

El trabajo de investigadores en la Universidad Rockefeller y en la Escuela de Medicina de la Universidad de Stanford, ha iluminado el papel crucial que la caquexina juega en la caquexia. El trabajo también demuestra que la caquexina puede inducir choque cuando las endotoxinas bacterianas causan la liberación de ésta. Finalmente, la caquexina ha emergido como el largamente buscado *factor de la necrosis de los tumores* (TNF), una sustancia secretada por la acción de las endotoxinas bacterianas y que puede promover la muerte rápida del tejido canceroso.

Durante una infección, la caquexina va a los adipocitos y ayuda a movilizar sus reservas de energía: libera la grasa que puede romperse y después metabolizarse por el organismo. Además de la liberación de la grasa, la caquexina parece reducir también la concentración de las enzimas cruciales para la producción y almacenamiento de la grasa. Sin las enzimas, la grasa no se acumula más. En pacientes con caquexia, el proceso aparentemente se lleva a un extremo. Las reservas de grasa se agotan por movilización excesiva acoplada con un consumo inadecuado de calorías y un estado hipermetabólico: el alimento se quema demasiado rápido e ineficientemente.

Anthony Cerami y Bruce Beutler de la Universidad

Rockefeller, trabajando con Frank M. Torti, Barbara Dieckmann y Gordon M. Ringold de la Universidad de Stanford, publicaron en Science, que han determinado cómo la caquexina deprime los niveles de las enzimas. Apparently el factor reduce severamente la cantidad de RNA mensajero transcrito por los genes que codifican a las enzimas requeridas para la producción de grasa. En ausencia de RNA mensajero, las enzimas no se producen.

Los investigadores hicieron este descubrimiento, midiendo el efecto de la caquexina sobre los niveles del RNA mensajero que codifica para las enzimas requeridas para la producción de grasa. Para hacerlo, agregaron caquexina a un lote de adipocitos de roedores, aislaron todo el RNA y midieron (por medio de una sonda radioactiva de DNA) el nivel del RNA que media la formación de grasa. Como se esperaba, la caquexina se asoció con niveles disminuidos de aquellos RNAs.

Los investigadores estudiaron después, si podían inducirse estos signos de la caquexia cuando los adipositos se expusieron a la caquexina. Observaron que ésta ocasionaba que las células perdieran sus gotitas de lípido acumuladas y bloqueaba la producción de más grasa, dos reacciones que se sabe tienen lugar durante la caquexia.

Cerami, Beutler y Milsark, también de la Rockefeller sabían que la caquexina juega un papel significativo en el choque producido por infecciones bacterianas de gérmenes gram negativos, como las de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Para explorar esta relación, inyectaron ratones con anticuerpos que se unen a la caquexina y la neutralizan. Entonces inyectaron a los ratones con una endotoxina bacteriana que se sabe provoca choque. Los ratones inmunizados pasivamente fueron protegidos. En los ratones que no habían recibido los anticuerpos, la endotoxina estimuló la liberación de la caquexina y murieron rápidamente de choque. Estos resultados sugieren una terapia potencial para el choque, basada en la neutralización de la caquexina.

Otros trabajos de miembros del grupo de la Rockefeller así como otros investigadores, revelaron que la caquexina y el factor de la necrosis tumoral (TNF) —que había sido aislado por Lloyd J. Old y sus colegas en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Research Institute— son la misma substancia. El primer indicio apareció cuando Beutler envió a John Mathison de la Fundación para la investigación, de la Clínica Scripps, una muestra de caquexina de ratón. Mathison puso la substancia con un grupo en el que se incluía un ensayo de actividad contra células tumorales. Se sorprendió al encontrar que la caquexina mataba las células tan eficientemente como lo hace el TNF.

Beutler comparó entonces la secuencia parcial de ami-

noácidos que él y sus colegas habían obtenido de la caquexina de ratón, con el segmento correspondiente del TNF humano, cuya estructura se conoce. Los dos fragmentos compartían 15 de los 20 aminoácidos, lo que sugiere que las dos proteínas son homólogas. Esta conclusión se confirmó cuando Lucie Fransen en Biogen S. A., determinó la secuencia completa de aminoácidos de la caquexina de ratón, tarea que Beutler y sus colegas también completaron con éxito.

¿Cómo produce el choque la caquexina y cómo destruye las células tumorales? Los dos efectos pueden estar relacionados con la capacidad de la caquexina para disminuir las concentraciones del RNA mensajero. En el choque, las endotoxinas pueden causar una liberación de caquexina, ésta puede bajar las concentraciones del RNA y por lo tanto disminuir las funciones celulares vitales. En el tejido tumoral, las endotoxinas pueden ocasionar también la liberación de caquexina, lo cual es como decir TNF. En este caso, sin embargo, el factor puede específicamente afectar al RNA que media la bioquímica de las células tumorales.

Los científicos de varias compañías de biotecnología están analizando afanosamente la caquexina, cortando las moléculas o sintetizando segmentos de ella e introduciendo los pedazos en cultivos celulares.

Un investigador de Biogen especula que la parte de la molécula que es responsable de la actividad antitumoral es diferente de la parte responsable del choque. Se ha empezado el trabajo sobre una segunda generación de moléculas: fragmentos de caquexina que podrían iniciar la actividad antitumoral sin producir efectos secundarios como el choque.

En la compañía farmacéutica Asahi del Japón, están siendo valoradas las aplicaciones clínicas de la caquexina.

Dr. Guillermo Carvajal S.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional

SE CREO EL INSTITUTO DE
FISIOLOGÍA CELULAR

El Consejo Universitario de la UNAM, en su sesión del

30 de mayo de 1985, aprobó que el Centro de Investigaciones en Fisiología Celular se transforme en el Instituto de Fisiología Celular.

La vida de este instituto ha estado ligada desde sus inicios con la de la Facultad de Medicina. En el año de 1973 un grupo de profesores de la División de Investigación dejó el Departamento de Bioquímica, para sumarse a otros profesores del Departamento de Biología Experimental del Instituto de Biología y formar un grupo multidisciplinario que en enero de 1979 dio origen al Centro de Investigación en Fisiología Celular.

La relación estrecha entre Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Medicina se pone de manifiesto en dos hechos: primero, de los veintiseis investigadores de tiempo completo que integran actualmente el personal académico del Instituto, dos terceras partes fueron profesores de la Facultad de Medicina. Algunos de ellos aun continúan colaborando en la docencia, a nivel licenciatura y posgrado en esta Facultad. Segundo, de los estudiantes de maestría y doctorado en Ciencias Biomédicas de esta Facultad, una docena está realizando su trabajo de laboratorio en investigación con asesores del Instituto.

En lo seis año que funcionó como Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, el grupo multidisciplinario que constituye ahora el Instituto de Fisiología Celular logró consolidarse, alcanzó madurez y tuvo una producción científica muy valiosa, que lo coloca como uno de los núcleos de investigación que va a la vanguardia en nuestro país.

Nos congratulamos del nacimiento del Instituto de Fisiología Celular y felicitamos, a través de su director. Dr. Antonio Peña Díaz, a cada uno de los miembros del mismo.

Juan C. Díaz Zagoya.

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CONVOCATORIA

El Colegio de Ciencias y Humanidades, mediante su Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado, y el Instituto de Investigaciones Biomédicas comuni-

can el inicio de inscripciones al *Proyecto Académico de Especialización, Maestría y Doctorado en Biotecnología*.

PROPOSITO GENERAL

Formación de profesionales, profesores e investigadores, de elevado nivel académico, capaces de llevar a cabo actividades docentes de investigación y desarrollo tecnológico e industrial en el campo de la biotecnología.

Las actividades de este Proyecto Académico se desarrollan en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología.

El registro de aspirantes se llevará a efecto a partir de hoy, 3 de febrero.

Los planes de estudio tendrán duración de dos semestres para el nivel de Especialización, de tres semestres para la Maestría y de cuatro semestres para el Doctorado.

REQUISITOS DE INGRESO

Nivel de Especialización

- Contar con una licenciatura o grado académico en el área químico-biológica o en áreas relacionadas con ella.*
- Presentar un examen-diagnóstico sobre Matemáticas, Físico-Química, Química Orgánica y Bioquímica.
- Aprobar un examen de comprensión del idioma inglés que versará sobre temática biotecnológica.
- Ser aceptado por la Comisión de Admisión del Proyecto.

Nivel de Maestría

- Contar con una licenciatura o grado académico en el área químico-biológica o en áreas relacionadas con ella.*
- Cumplir satisfactoriamente con el periodo propedéutico de Maestría.
- Aprobar un examen de comprensión del idioma inglés que versará sobre temática biotecnológica.
- Ser aceptado por la Comisión de Admisión del Proyecto.

Nivel de Doctorado

- Tener un Título Profesional y haber cubierto el plan de estudios de la Maestría en Biotecnología o de alguna de las siguientes: Investigación Biomédica Básica, Ciencias Químicas, Biomedicina, Ciencias Biomédicas, Microbiología o en áreas relacionadas con este campo.*
- Aprobar un examen de comprensión del idioma inglés que versará sobre temática biotecnológica.

- Presentar oralmente una síntesis del trabajo, realizado durante la Maestría, y el Proyecto que pretende desarrollar en el Doctorado, a una Comisión de Admisión nombrada para cada candidato por el Consejo Interno del Proyecto, y ser aceptado por la misma.

PERIODO PROPEDEUTICO

- Constará de dos cursos y trabajo de investigación. Los cursos se impartirán en ambas cosedes con el fin de actualizar a los aspirantes en sus conocimientos básicos de Microbiología Aplicada, Ingeniería Bioquímica, Bioquímica Aplicada o Procesos y Proyectos.
- El trabajo de Investigación se desarrollará en el laboratorio que le sea asignado al aspirante como resultado de su entrevista con el cuerpo de tutores del Proyecto.

CALENDARIO DE ACTIVIDADES

Registro de aspirantes.

— Hasta el 4 de marzo de 1986

Reunión del Coordinador con los aspirantes a Especialización y Maestría en la coordinación del Proyecto

— 3 de marzo de 1986, a las 17:00

Examen-diagnóstico para aspirantes a Especialización

— 10 de marzo de 1986, a las 17:00

Examen de comprensión del idioma inglés

— 14 de marzo de 1986

Reunión de las Comisiones de Admisión con los aspirantes de Especialización y Maestría

— 20 de marzo de 1986

Reunión de la Comisión de Admisión con los aspirantes de Doctorado

— 21 de marzo de 1986 (fecha límite)

Periodo de inscripciones

— Del 21 al 25 de abril de 1986

Inicio de actividades académicas

— 21 de abril de 1986

Duración del curso propedéutico

— Del 21 de abril al 19 de septiembre de 1986

INFORMACION Y ENTREVISTAS

Coordinación de la Especialización, Maestría y Doctorado en Biotecnología UNAM, Ciudad Universitaria, D.F., Código Postal 04510, teléfono 550-52-15 extensión 3591.

* Los aspirantes provenientes de Instituciones diferentes a la UNAM deberán obtener el dictamen de Suficiencia Académica de sus estudios previos por medio de la Secretaría Ejecutiva del Consejo de Estudios de Posgrado. En tanto se obtiene el dictamen, la inscripción será condicional.

“DE NUESTROS LECTORES”

El Comité Editorial del Boletín de Educación Bioquímica, ha sentido la necesidad de abrir un espacio que le permita tener una idea más clara de la reacción que esta revista produce en sus lectores.

No obstante que con frecuencia se han recibido opiniones acerca de diversos aspectos de la revista, por lo general éstas han sido esporádicas y no han tenido la difusión que permita compartirlas y contrastarlas con las de otros de nuestros lectores.

Es por esto que a partir del próximo número, se incluirá el espacio “DE NUESTROS LECTORES” en el que serán bien recibidas todas las opiniones, sugerencias, solicitudes etc., que los lectores consideren que puedan contribuir a la evolución del BEB.

El material para este espacio, deberá remitirse al Coordinador Editorial, Dra. Yolanda Saldaña de Delgado.

Jesús Manuel León Cázares
Instituto de Fisiología
Celular, UNAM.

INDICES DE REVISTAS

ciencia
y desarrollo

MARZO-ABRIL 1986

INDICE

Carta del editor	2
Cartas de nuestros lectores	3
De frontera	5
Signos y síntomas de la creatividad Adolfo Martínez-Palomo	17
El telar mágico de la ciencia Hugo Aréchiga U	25
La originalidad en la ciencia y en el arte Marcelino Cerejido y Fanny Blanck	39
Einstein y la curvatura del espacio Francisco Salvador Ramírez Avila	45
El alcatraz, un ave marina desconocida Rodrigo Vargas Yáñez y Regina Vargas Baena	61
Formación de profesionales en política científica Yakov M. Rabkin	73
Informetría: un nuevo nombre para una nueva disciplina O Nacke	83
Ley para coordinar y promover el desarrollo científico y tecnológico	95
Historia gráfica de la astronomía en México	101
Tercera y última parte	
109 Reflexiones Las pautas y los patrones Horace Freeland Judson	
125 Nota científica Filtración de alta eficiencia de gases especiales en las industrias de transformación E.W. Blakie	
129 Desarrollo científico y tecnológico CONACYT en 1984	
161 Descubriendo el universo	
170 La era digital Primera década de la computación en México: 1958-1968, segunda parte Miguel M. Soriano y Christian Lemaître	
178 Ciencia ficción Kubrick's 2002 por Guillermo Farber	
183 Gente y sucesos	
189 Los autores	
192 Notas bibliográficas	
197 Reuniones y cursos	

Portada: Imagen digital de la estrella R Corona Australis y su nebulosidad asociada. Esta imagen se obtuvo con el detector MEPSICRON y posteriormente fue procesada con la computadora PRIME del Instituto de Astronomía de la Universidad Nacional Autónoma de México.

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la bioquímica y en áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes no especializados, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea simple explícita y didáctica. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Solicitamos a los autores se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial.

I. ARTICULOS DE REVISION

- 1) *El manuscrito no debe exceder de 12 cuartillas escritas a máquina a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por renglón.)*
- 2) *Se aceptarán como máximo 6 figuras o tablas. La limitación en el número de figuras, tablas y referencias obliga a los autores a que seleccionen aquellas realmente importantes e informativas. Numere las figuras con números arábigos y las tablas con números romanos. Adicione las leyendas y pies de figuras en una hoja aparte. Considere que las figuras y tablas serán reducidas de tamaño, aproximadamente a 1/2 o 1/4 de la hoja carta, las letras o números más pequeños, una vez hecha la reducción no deben ser menores a los 2 mm.*
- 3) *Sugerimos un máximo de 10 referencias tanto específicas como lecturas recomendadas. Cada referencia debe contener: nombre(s) del autor(es), año entre paréntesis, título del artículo, nombre de la revista, volumen a cursiva y el número de la primera y última páginas. Ejemplos:*

- a) *Miller, C.O. (1982). Cytokinin Modification of Mitochondrial Function. Plan Physiol, 69, 1274-1277.*
- b) *Larkins, B.A., Pearlmutter, N.L. y Hurkman, W.J. (1979). The mechanism of zein synthesis*

and deposition in protein bodies of maize endosperm. En The Plant Seed. Development, Peservation, and Germination, Editores: Rubenstein, I., Phillips, R.L., Green, C.E. y Genenbach, B.G. Academic Press. New York. pp. 49-55.

- 4) *Evite hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes utilizadas en el texto deberán, enlistarse en la primera página.*

II. OTRAS COMUNICACIONES

- 1) *El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, bolsa de trabajo, etc.*
- 2) *El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera muy explícita.*
- 3) *El manuscrito debe ser de una o cuatro cuartillas de longitud, escritas en máquina a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por línea).*
- 4) *Se aceptarán un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto. En casos en que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o tabla.*

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

Envíe el original y dos copias de los manuscritos a la Dra. Yolanda Saldaña de Delgadillo. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Apdo. Postal 70-159, Delegación Coyoacán, 04510 México, D.F., o al Dr. Alberto Hamabata, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740, 07000 México, D.F. o bien a través del corresponsal BEB.