BEB 89
BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

VOLUMEN 8 No. 1 MARZO 1989

EDITORIAL

SOBRE EL LENGUAJE BIOQUIMICO

Desde su fundación en 1957, la Sociedad Mexicana de Bioquímica y sus sucesivas mesas directivas, se han preocupado por el problema de la adecuación del lenguaje científico y, en especial, del lenguaje bioquímico, al español por muy variadas y válidas razones. A falta de un organismo regidor, cada investigador ha decidido, con acierto o sin él, cómo debe traducir o adaptar al español las palabras provenientes generalmente del inglés. Esto ha dado lugar a multitud de traducciones erróneas o a verdaderos barbarismos, producto, por un lado, del desconocimiento de ambos idiomas (y de sus raíces griegas y latinas) y por el otro de la renuencia fundamental a consultar una serie de diccionarios y textos gramaticales antes de elaborar una proposición concreta.

Los intentos de creación de una comisión encargada explícita y exclusivamente de los menesteres mencionados, terminaron hasta ahora, en el fracaso absoluto por diversas causas. Una de ellas es la inercia que nos lleva a negarnos a cambiar una palabra o una expresión por otra, si la hemos venido utilizando (incorrectamente) por muchos años. Otra es la actitud fácil de concluir que una palabra o expresión de otro idioma no tiene equivalente en el nuestro, o lo que es lo mismo, es intraducible. Y otra más, es la de no aceptar una "autoridad" que imponga nuevos términos.

En el XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, que tuvo lugar del 6 al 11 de noviembre de 1988 en Oaxaca, ante la preocupación manifestada vehemente por algunos de nuestros miembros veteranos, por el deterioro evidente del lenguaje utilizado por investigadores, maestros y estudiantes graduados, se decidió nombrar una comisión que se aboque al estudio del problema.

En sus primeras reuniones, la Comisión de Defensa del Lenguaje Bioquímico estableció algunas premisas y normas que exponemos por este conducto a todos los miembros de la comunidad Bioquímica. 1) La defensa del

Pasa a la pág. 3

COMITE EDITORIAL

ALFONSO CARABEZ TREJO
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

ALBERTO HAMABATA NISHIMUTA
Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN

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

CARLOS LARRALDE RANGEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

JESUS MANUEL LEON CAZARES
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina, UNAM

SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COORDINADOR EDITORIAL
YOLANDA SALDAÑA DE DELGADILLO
Facultad de Medicina, UNAM

EDITOR ASOCIADO
ALICIA CEA BONILLA
Facultad de Medicina, UNAM

ASISTENTE EDITORIAL
ELISA MORA
Facultad de Medicina, UNAM



Facultad de Medicina

UNAM

INDICE

BEB 89 Vol. 8 Núm. 1 marzo 1989

EDITORIAL

SOBRE EL LENGUAJE BIOQUIMICO
La Comisión de Defensa del Lenguaje Bioquímico, Wilhelm Hansberg, Homero Hernández y Alberto Huberman.....1

ARTICULOS

ENZIMAS LIPOLITICAS DE ORIGEN MICROBIANO: PROPIEDADES Y USOS
Espinosa, E., Nurko, E., Orozco, M.E. y Farres, A.....3

EL ANALISIS ESTRUCTURAL DEL GEN μEGF EN EL ERIZO DE MAR APORTA NUEVOS DATOS QUE APOYAN LA HIPOTESIS QUE RELACIONA A LOS EQUINODERMOS CON LOS CORDADOS
M en C. María Guadalupe Delgadillo Reynoso.....11

OTRAS COMUNICACIONES

NUEVOS METODOS PARA MARCAR SEGMENTOS DE POLINUCLEOTIDOS O GENES ESPECIFICOS
(Jablonski, E., Moomaw, E. W., Tullis, R. H. y Ruth, J. L.)
Raúl Arredondo Peter y Elia Pedroza Jurado, comentaristas..... 19

DEL BUEN DECIR... (1)..... 20

CINCO PREGUNTAS SOBRE BIOLOGIA CELULAR
(León-Cázares, J. M.)
Raúl Arredondo Peter, comentarista..... 21

CARTA A LOS EDITORES

Raúl Arredondo Peter..... 22

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA.....24

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB) es una publicación trimestral editada por su Comité Editorial,
Correspondencia: Yolanda Saldaña de Delgadillo. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina UNAM. Apdo. Postal 70-281.
Delegación Coyoacán. 04510, México, D. F.

Viene de la pág. 1

SOBRE EL LENGUAJE...

lenguaje debe tener para todos nosotros una importancia equivalente a la defensa de la soberanía nacional, pues es parte de una de sus manifestaciones más atacadas y subvertidas, la cultura;
2) No se tratará en ningún caso de "imponer" decisiones (que sólo serán tomadas por unanimidad), sino de ofrecer sugerencias, basadas en razonamientos sólidos y abiertas a discusión; 3) En caso necesario, la Comisión se asesorará con expertos en Filología, Gramática, Latín, Griego y en todo lo que se considere necesario para tomar decisiones válidas; 5) Se establecerá una columna que aparecerá en cada número del Boletín de la S.M.B. y del Boletín de Educación Bioquímica (B.E.B.) con nuestras proposiciones, así como se contestará toda pregunta o se aclararán las dudas de nuestro público lector; 6) Se tratará de influir sobre los comités editoriales de las distintas publicaciones científicas mexicanas, así como sobre los comités de revisión de resúmenes de nuestros congresos, para que estas sugerencias sean aceptadas en la práctica; 7) No nos abocaremos a corregir errores gramaticales o sintácticos generales, sino que nos concretaremos al lenguaje científico exclusivamente.

Por último, hacemos un llamado a toda la comunidad bioquímica de México a abordar con sentido crítico positivo y con verdadero amor por nuestra tradición cultural el problema del cuidado del lenguaje. ¡ No nos dejemos vencer por la contaminación ni por la inercia !

La Comisión de Defensa del Lenguaje Bioquímico (Wilhelm Hansberg, Homero Hernández y Alberto Huberman)

ENZIMAS LIPOLITICAS DE ORIGEN MICROBIANO: PROPIEDADES Y USOS

Espinosa, E., Nurko, E., Orozco, M.E. y Farres, A.
Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM., Apdo. Postal 70-228, 04510 México, D.F.

RESUMEN

Las lipasas (EC 3.1.1.3) hidrolizan enlaces tipo éster, generando ácidos grasos, y mono o diacilgliceroles. Ocupan una porción pequeña del mercado mundial de enzimas, pero su uso tiende a incrementarse, debido al avance en el conocimiento que se ha dado sobre el comportamiento de enzimas en sistemas no acuosos. Algunas de las propiedades más relevantes de este grupo de enzimas son: su capacidad de llevar a cabo reacciones en la interfase agua-grasa, su especificidad hacia diferentes longitudes de cadena de ácido graso o hacia posiciones de los mismos en el triacilglicerol. Estas propiedades se correlacionan con los posibles usos de estas enzimas. Entre las principales aplicaciones de las mismas destaca su uso en la fabricación de saborizantes en productos lácteos. Pueden emplearse también en la modificación de grasas para conferir nuevas propiedades fisicoquímicas y en la síntesis de productos químicos de alto valor agregado. Las perspectivas de crecimiento del mercado dependen de la obtención de enzima por vías económicas, así como del avance en el conocimiento de la operación de reactores.

INTRODUCCION

El mercado mundial de enzimas industriales está dominado por las amilasas, proteasas e isomerasas. La mayor cantidad de desarrollos tecnológicos corresponden a estas enzimas y el volumen que ocupan en el mercado es cercano al 90%. Existe un grupo de enzimas que ocupan sólo el 3% del mercado (1) y que, sin embargo, ha atraído el interés de numerosos grupos de investigación al presentar una serie de posibilidades de aplicación muy amplia y variada. Nos referimos a las lipasas y esterasas (EC 3.1.1.3).

Si bien estas enzimas se han utilizado desde hace más de 50 años, es hasta la última década cuando se analizan con mayor cuidado las posibilidades de producción a mayor escala. Esto se debe a su uso en la elaboración de saborizantes, a su uso potencial en detergentes y en la fabricación de productos químicos de alto valor agregado. Esto ha sido posible gracias al avance en el conocimiento de los mecanismos de acción enzimática en sistemas no acuosos.

Los términos lipasa y esterasa se han utilizado durante mucho tiempo en forma prácticamente indistinta. La mayoría de los autores actuales coinciden en distinguirlas mediante el tipo de sustrato sobre el que actúan: se considera como lipasas a aquellas enzimas que hidrolizan enlaces éster cuando el sustrato está emulsificado y su actividad ocurre principalmente en la interfase agua-grasa; por otro lado, las esterasas hidrolizan el mismo tipo de enlace cuando el sustrato se encuentra en solución. En los dos casos se pueden encontrar diferencias en estereoespecificidad y en afinidad por el tipo de cadena lateral, esto es, diferente longitud y distribución de los dobles enlaces sobre los que pueden actuar. Estas propiedades deben ser consideradas y evaluadas adecuadamente en relación al uso que pueda darse a las enzimas.

Las lipasas hidrolizan tri, di y monoacilgliceroles, rara vez totalmente, por lo que los productos de reacción son diversos di y monoacilgliceroles y ácidos grasos libres. Según las condiciones de reacción, las lipasas pueden emplearse en la producción de compuestos de interés, tanto en reacciones de hidrólisis como de síntesis, y en este último caso los productos de la reacción son ésteres.

Inicialmente, las enzimas lipolíticas introducidas al mercado eran enzimas aisladas de glándulas de ternera o de carnero. Estas se usaron para la producción de sabores picantes, característicos de algunos quesos italianos. En la década de los setenta se acentuó el interés por la búsqueda de enzimas de origen microbiano, capaces de llevar a cabo reacciones similares. Las ventajas de las de los microorganismos sobre las de animales, en cuanto a la facilidad de producción y recuperación, mejoramiento genético e independencia de factores estacionales, son obvias. Además, la gran diversidad de enzimas microbianas permite predecir una variedad de usos y mecanismos de acción, que podrían incrementar las posibilidades de aplicación. En la actualidad se conocen numerosos microorganismos productores de estas enzimas, algunos de los cuales se ejemplifican en la Tabla I.

TABLA I

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LIPASAS

BACTERIAS	HONGOS	LEVADURAS
Acinetobacter calcoaceticus	*Aspergillus flavus*	*Candida cylindracea*
Achromobacter lipolyticum	*Aspergillus lipolyticum*	*Candida paralipolytica*
Alcaligenes faecalis	*Aspergillus niger*	*Pichia sp*
Bacillus cereus	*Fusarium oxysporum*	*Sporobolomyces sp.*
Bacillus mycoides	*Geotrichum candidum*	*Torulopsis sp.*
Bacillus subtilis	*Humicola lanuginosa*	*Trichosporon sp.*
Corynebacterium acnes	*Mucor javanicus*	
Chromobacterium viscosum	*Mucor lipolyticus*	
Leptospira pomona	*Mucor miehie*	
Mycobacterium freudenreichii	*Penicillium candidum*	
Mycobacterium lipolyticus	*Penicillium cyclopium*	
Mycobacterium nacreaceus	*Penicillium roqueforti*	
Mycobacterium phlei	*Rhizopus arrhizus*	
Mycoplasma gallisepticum	*Rhizopus delemar*	
Pseudomonas aeruginosa	*Rhizopus japonicus*	
Pseudomonas fluorescens	*Sclerotina laxa*	
Pseudomonas fragi		
Pseudomonas gladioli		
Pseudomonas nitroreductans		
Serratia sp.		
Staphylococcus aureus		

PROPIEDADES

Un microorganismo puede producir más de una lipasa o isoenzimas, las que seguramente tendrán diferentes propiedades. La mayoría de las lipasas conocidas son glicoproteínas ácidas, con pesos moleculares que varían entre 20000 y 60000 dalton. Contienen de un 2 a un 15 por ciento de carbohidratos, principalmente manosa, que provocan frecuentemente la formación de agregados, pero que no parecen tener que ver con la acción catalítica. Aunque se ha sugerido que la interacción con grupos hidrofóbicos se debe a una alta proporción de aminoácidos de este tipo, las secuencias de aminoácidos conocidas no apoyan esta idea. La mayoría de las enzimas estudiadas no son estables a temperaturas superiores a 40°C, lo que limita sus usos potenciales, especialmente en reactores a gran escala. Algunas enzimas bacterianas termorresistentes son importantes por sus efectos nocivos en la conservación de productos lácteos. Actúan en un rango de pH entre 5 y 9, con un pH óptimo cercano a la neutralidad. Salvo en algunos casos, no se conocen cofactores o activadores. En cambio, se sabe que son frecuentemente inhibidas por agentes surfactantes, como el Tween y las sales biliares. La presencia de sales, como el cloruro de calcio en concentraciones del orden de 0.001 M,

afecta la velocidad de reacción, al producirse sales con los ácidos grasos liberados. El calcio también puede incrementar la estabilidad térmica de las enzimas.

La enzima puede interactuar con el glicerol o con el ácido graso del triacilglicerol. En ese último caso puede variar la preferencia según la longitud de la cadena y el número y posición de los dobles enlaces. *Geotrichum candidum* presenta el mayor grado de especificidad conocido, al hidrolizar ésteres de ácidos grasos de cadena larga con una doble ligadura en la posición 9. Por otra parte, la afinidad puede verse afectada por las condiciones de reacción; por ejemplo, *Mucor miehie* libera ácido butírico a partir de grasa de leche cuando el pH es ácido.

Las lipasas se dividen en dos grupos: las que catalizan la hidrólisis de ácidos grasos localizados en cualquier posición del triacilglicerol, o las que lo hacen sólo con los enlaces en posición 1, 2 ó 3. Esto afectará el grado de hidrólisis que se puede alcanzar en una reacción (2).

A continuación se analizan algunos ejemplos de aplicaciones de estas enzimas, de acuerdo al campo de utilización y al tipo de reacción que se emplea.

REACCIONES DE HIDROLISIS

El campo de generación de sabores en productos lácteos es en el que las enzimas lipolíticas han encontrado mayor variedad de usos y aplicaciones a nivel industrial. Desde el año de 1937 se patentó un producto hidrolizado con lipasa obtenida de glándula pregástrica de cabrito. Se trataba de una leche lipolizada que se utilizó como ingrediente en la elaboración de queso. La introducción de las enzimas microbianas permitió diversificar los sabores obtenidos, ya que inicialmente sólo se podían generar los aromas característicos de los quesos italianos, como el Mozarella y el Romano. En este campo son particularmente importantes las enzimas que presentan afinidad por los ácidos grasos de cadena corta, en el rango de 4 a 10 carbonos. Actúan sobre los triacilgliceroles, principales componentes de la grasa de la leche, y liberan los ácidos grasos, que serán responsables de la generación de ciertas notas de sabor características, ya sea por sí mismos o por conversión a otros compuestos por causas químicas o enzimáticas, como son las lactonas y cetonas. Algunos de los compuestos responsables del sabor en quesos y sus vías de formación se presentan en la figura 1.

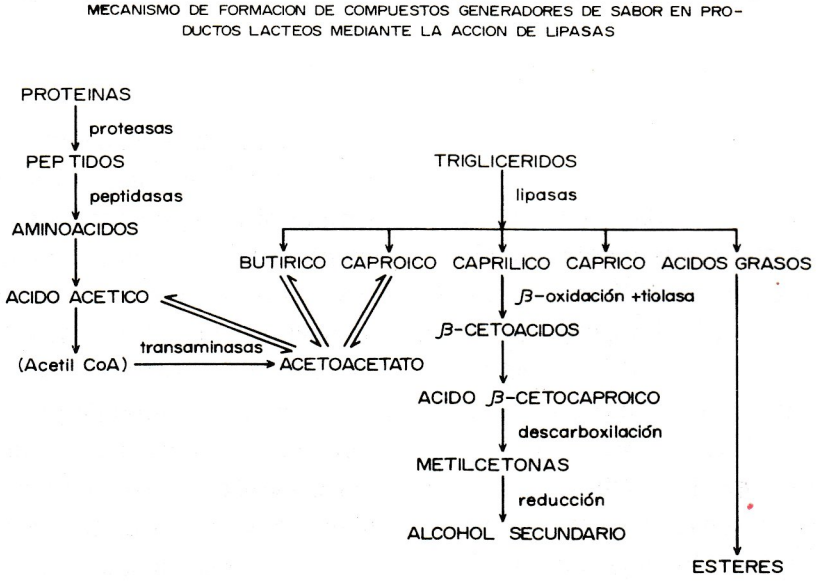


Figura 1. Mecanismo de formación de compuestos generadores de sabor en productos lácteos mediante la acción de lipasas.

La aplicación de estas enzimas en productos lácteos tiene diversos fines. Entre éstos destacan la generación de sabores intensos en productos que después son empleados como saborizantes, particularmente en la elaboración de quesos procesados, mantequillas, confitería y botanas. Los ingredientes elaborados por esta vía conservan propiedades nutricionales y pueden ser empleados para la obtención de sustitutos con mejores atributos. Por ejemplo, puede reducirse el contenido graso de un queso, o mejorar la calidad de la grasa constituyente del mismo. Se pueden estandarizar lotes de leche de diferente origen y acelerar la maduración de quesos, evitando el uso de compuestos químicos empleados como saborizantes y la utilización de otros adulterantes (3,4).

La problemática de producción de saborizantes difiere de país a país, tanto por tradiciones culinarias como por el poder adquisitivo de la población y la regulación en el campo de alimentos. En México, país que no tiene una gran tradición quesera, y en donde el consumidor prefiere los sabores suaves, existe interés por encontrar enzimas que proporcionen sabores lácteos intensos, pero que no contengan los compuestos que proporcionan los aromas fuertes característicos de quesos madurados, para satisfacer el gusto del consumidor local.

OTRAS REACCIONES DE HIDROLISIS

La producción de ácidos grasos o sus derivados, que se utilizan como agentes emulsificantes, surfactantes y saborizantes, se lleva a cabo normalmente por la hidrólisis alcalina del sebo. Estas reacciones son sucias e ineficientes, por lo que la utilización de enzimas en la industria oleoquímica ofrece posibilidades de obtener productos con mayor grado de pureza. Sin embargo, su costo de producción resulta aún elevado y poco competitivo; el principal problema a resolver consiste en la selección de enzimas con especificidad adecuada, que posean la termoestabilidad y eficiencia de operación en reactores que den lugar a un proceso costeable (5). Entre las alternativas a explorar están el uso de reactores con células completas, la inmovilización de enzimas, el acoplamiento a cofactores y el incremento en rendimientos por el uso de mutantes (6).

La hidrólisis de grasas hace que las lipasas sean particularmente útiles en los procesos de limpieza. Las enzimas proteolíticas revolucionaron la industria de los detergentes, logrando vencer severas disposiciones regulatorias. Las enzimas lipolíticas pueden representar una segunda época en los detergentes enzimáticos. El problema que se presenta es encontrar una enzima que resista las severas condiciones de temperatura y alcalinidad que se presentan en el proceso de lavado. La fuente de enzima resulta crítica y se considera que los microorganismos termofílicos ofrecen mayores oportunidades de obtención de una enzima con estas características. Nuestro país tiene algunas zonas que podrían servir como fuente de microorganismos con estas características, por lo que equipos de investigación, tanto nacionales como extranjeros, han emprendido la búsqueda de los mismos. Internacionalmente, uno de los organismos que se ha reconocido como más prometedor es *Humicola lanuginosa* debido a que presenta buena actividad a temperaturas altas y a pH alcalino.

Otra reacción de interés para la producción de compuestos químicos de alto valor es la resolución de mezclas racémicas, al llevar a cabo una reacción de hidrólisis, posible gracias a la estereoespecificidad de las enzimas. En este concepto destacan varias enzimas provenientes de bacterias, como *Brevibacterium ammoniagenes, Pseudomonas aeruginosa,* diversos *Streptomyces*, hongos como *Fusarium* y *Candida*. Entre los productos que se han obtenido exitosamente pueden citarse el diacetato de boldino, isoamil butirato, ácido bromopropiónico y otros ésteres de alcoholes epóxicos (7).

REACCIONES DE INTERESTERIFICACION

En determinadas condiciones de reacción las enzimas lipolíticas pueden llevar a cabo la sustitución de componentes de un triacilglicerol. La repercusión económica de esta reacción radica en la posibilidad de modificar las propiedades de determinadas grasas y aceites al sustituir elementos que, por ejemplo, incrementen el punto de fusión o que alteren las propiedades de cristalización. La introducción de moléculas de ácido esteárico al aceite de palma, sustituyendo parcialmente las de oleico o palmítico ha permitido obtener sustitutos de cocoa a partir de aceite de palma, con puntos de fusión cercanos a la temperatura corporal humana. La introducción de los mismos ha provocado un descenso en el precio internacional del chocolate. Los países exportadores de materias primas, como México, deben vigilar la repercusión de estos procesos y emplear alternativas que la misma tecnología les ofrece. El país es rico en oleaginosas cuyos aceites no han sido bien caracterizados, y que pueden ser modificados enzimáticamente, aumentando así su valor comercial y permitiendo el aprovechamiento de recursos que, a la fecha, están inexplotados y que competirían con los aceites tradicionales (8). Es importante hacer notar que estas reacciones de modificación sólo son posibles por vía enzimática y no se pueden lograr con catálisis química por la inespecificidad del proceso. Sin embargo, para que se logren implementar a nivel industrial, los reactores enzimáticos deberán tener un costo de operación reducido y el éxito comercial dependerá de las fluctuaciones en los precios de las materias primas. Una de las principales limitantes es que las reacciones no se llevan a cabo en fase acuosa, por lo que se requieren solventes orgánicos, lo que encarece el proceso y eleva la complejidad del mismo. Por su especificidad, entre las enzimas que mayor potencial tienen en este campo están las de *Aspergillus niger*, de *Mucor javanicus* y de varias especies de *Rhizopus*.

La interesterificación enzimática, a diferencia de la química, permite la sustitución específica tanto en la posición del ácido graso en el triacilglicerol, como del tipo de ácido. Una de las aplicaciones que mayores expectativas ha despertado es la posible sustitución de ácido oleico por ácidos tipo omega-tres, como el linoleico y el araquidónico, a los que se les ha atribuído un papel en la disminución de niveles de colesterol en plasma y, por consiguiente, la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Se podrían preparar aceites comestibles, margarinas, mantequillas, leche y otros productos con estos nuevos triacilgliceroles, que conservarían sus propiedades y funciones nutricionales, pero que provocarían menos riesgo de padecimiento de enfermedades del aparato circulatorio.

REACCIONES DE SINTESIS

Las reacciones de hidrólisis reversa han sido particularmente útiles para la formación de ésteres, a partir de diversos alcoholes. El factor limitante ha sido la adecuada eliminación de agua, la que puede lograrse por métodos como el uso de polímeros, glicerol o secado. Los productos que se pueden obtener de esta manera son, generalmente, de consumo especializado, no se requieren muchas toneladas, y se utilizan como fragancias, saborizantes, emulsificantes, así como en productos farmacéuticos. Algunos de ellos se señalan en la Tabla II.

TABLA II

COMPUESTOS QUIMICOS OBTENIDOS MEDIANTE LA ACCION DE LIPASAS

monoglicérido	industria química
ésteres de decadienoato	industria química
acetato de geranilo	saborizantes
D-L carvona	industria química
ácidos [S]-2 halopropiónicos	industria química
ésteres de glicidol	industria química
ésteres de alcoholes epóxicos	industria química
bloqueadores ß-adrenérgicos	industria farmacéutica

Fuente: 7, 11, 12.

Un tipo de ésteres que se pueden sintetizar con lipasas y esterasas es el de los péptidos. La síntesis de los mismos con proteasas se ha llevado a cabo, pero presenta el problema de baja eficiencia por la misma acción proteolítica. Como las lipasas no presentan actividad en este sentido, los rendimientos son mayores (9). Estas reacciones también deben llevarse a cabo en solventes orgánicos, y la enzima de *Candida cylindracea* es la que presenta mayores perspectivas para competir con las enzimas pancreáticas en uso.

OTROS USOS

En el campo de aplicación de enzimas es cada vez mayor el valor del sector destinado a diagnóstico y a fines analíticos. Las lipasas pueden también ser utilizadas con estos fines. Se requieren enzimas que hidrolicen totalmente triacilgliceroles y permitan cuantificar el glicerol liberado, que servirá como indicador de triacilgliceroles totales. Asimismo, pueden colaborar en la identificación de componentes ácidos de los triacilgliceroles (2).

Otro campo en el que se pueden emplear enzimas lipolíticas es en el tratamiento de desechos grasos, generados principalmente por industrias del sector alimentario. Mezclas de lipasas y microorganismos han sido utilizadas exitosamente con este fin (10), y se podrían probar con otros desperdicios y fuentes de contaminación.

PERSPECTIVAS

Las consideraciones anteriores permiten vislumbrar que el rango de aplicaciones en el que intervienen estas enzimas es muy amplio y que el mejor conocimiento de las mismas pueden diversificarlo aún más. El estudio del mecanismo de acción podría ayudar a manipular su especificidad, que es una limitante en el desarrollo exitoso de algunos procesos. Hay muchos aspectos desconocidos en torno a la forma de acción. El conocimiento de la estructura molecular y la secuencia de aminoácidos de las lipasas podría contribuir a la resolución de problemas en este campo. En este sentido, son enzimas bastante poco estudiadas y, por ejemplo, sólo se conoce la secuencia de aminoácidos completa de una enzima.

El desarrollo a nivel industrial de muchos de los procesos aquí planteados dependerá de la obtención de una fuente económica de enzima y de reactores eficientes. Para lograr el primer objetivo pueden plantearse varias estrategias, entre las que se cuenta la búsqueda de microorganismos con actividad lipolítica, principalmente entre los termófilos, con la idea de obtener lipasas termorresistentes. Otro camino sería el conocimiento de los mecanismos que regulan la producción de la enzima, para emprender estrategias racionales de mejoramiento genético, así como de optimización de medios de cultivo. Los estudios en este sentido son prácticamente inexistentes y no se tiene conocimiento de programas de mejoramiento genético, aunque se tienen aislados los genes procedentes de algunas especies de interés. Las

técnicas de clonación molecular permitirán acelerar este conocimiento, así como conocer las secuencias de aminoácidos y realizar mutagénesis *in vitro*.

La operación exitosa de reactores dependerá de un mejor conocimiento del comportamiento de los catalizadores en sistemas no acuosos, así como de los logros en el incremento de estabilidad térmica de las enzimas, áreas ambas que se encuentran aún en proceso de desarrollo.

En nuestro país pueden destacarse algunas aplicaciones. El campo de producción de saborizantes es un campo creciente, en el que varias compañías productoras de los mismos están interesadas. Ellos importan en la actualidad enzimas y tecnología, y tratan de generar productos aceptables por el consumidor local. La modificación de aceites de bajo costo a productos de mayor valor puede representar una alternativa de explotación de algunas oleaginosas, principalmente algunas producidas en zonas semidesérticas, y podría de esta manera la biotecnología contribuir a la reducción del déficit comercial de estas semillas. El mercado de detergentes está dominado por industrias trasnacionales, al igual que el sector farmacéutico, por lo que las posibilidades de aplicación están limitadas. Finalmente, el combate a la contaminación es una actividad prioritaria en el país y pueden explorarse los usos de estas enzimas en este terreno.

CONCLUSIONES

Es necesario conocer mejor las propiedades de las enzimas lipolíticas, pues existen aún muchos aspectos de las mismas desconocidos. El mejor conocimiento puede incrementar el uso y aplicación de las mismas.

Si bien las enzimas lipolíticas presentan una gran variedad de usos, no se prevé la utilización de estos catalizadores en grandes volúmenes. Sin embargo, su utilización puede permitir la obtención de productos de alto valor agregado para las industrias de alimentos y farmacia, principalmente, así como la resolución de problemas ambientales. Quedan aún muchos aspectos por optimizar para lograr la explotación comercial de muchos de los procesos planteados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Godfrey, T. y Reichelt, J. (1983). *Industrial Enzymology.* The Nature Press, Nueva York, pp 583.

2. Macrae, A. R. y Reichelt, J. (1985). *Present and future applications of lipases.* Biotechnol. Genet. Eng. Rev., **3**, 193-217.

3. Kilara, A. (1985). *Enzyme modified lipid food ingredients.* Process Biochem., **20**, 35-45.

4. Dziezak, J. (1986). *Biotechnology and flavor development: enzyme modification of dairy products.* Food Technol., **44**, 114-120.

5. Posorske, L.H. (1987). *Industrial scale applications of enzymes to the fats and oils industry.* J. Am. Oil Chem. Soc., **61**, 1758-1760.

6. Ratledge, C. (1987). *Lipid Biotechnology: a wonderland for the microbial physiologist.* J. Am. Oil Chem. Soc., **64**, 1647-1656.

7. Zaks, A., Empie, M. y Gross, A. (1988). *Potentially commercial enzymatic processes for the fine and specialty chemical industries.* Trends. Biotechnol., **6**, 272-275.

8. Schuch, R. y Mukherje, D. (1987). *Interesterification of lipids using an immobilized sn-1,3 specific triacylglycerol lipase.* J. Agric. Food Chem., **25**, 1005-1008.

9. Matos,J., Blair, J.y Wong, C.H. (1987). *Lipase catalysed synthesis of peptides: preparation of a penicillin G precursor and other peptides.* Biotechnol. Lett., **9**, 233-236.

10.Anonimo. (1987). *Enzymes solve waste problem. Food Process.*, **41**, 35-38.

11.Kloosterman, M., Elferink, V., van Lersel, J., Roskam, J. H., Meijer, E., Hulshof, L. y Sheldon, R. (1988). *Lipases in the preparation of B-blockers.* Trends Biotechnol., **6**, 251-256.

12. West. S. (1987). *Flavouring with enzymes.* Food, **39**, 39-43.

EL ANALISIS ESTRUCTURAL DEL GEN μEGF EN EL ERIZO DE MAR APORTA NUEVOS DATOS QUE APOYANLA HIPOTESIS QUE RELACIONA A LOS EQUINODERMOS CON LOS CORDADOS

M. en C. María Guadalupe Delgadillo Reynoso.
Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Puebla,Puebla, Pue. Méx.

INTRODUCCION

En los últimos años se ha generado un gran interés por tratar de comprender los procesos evolutivos a nivel molecular. Una de las ventajas que presenta este enfoque es el poder comparar la evolución del genoma en organismos muy alejados filogenéticamente. Este tipo de comparaciones resultaba imposible con análisis morfológicos o paleontológicos.

El genoma de un organismo está formado por cadenas de ácido desoxirribonucleico o ADN de doble hélice, el cual posee en su estructura la información genética dividida en segmentos llamados genes. Los genes, constituídos por la secuencia de nucleótidos (en cuya estructura son fundamentales las bases nitrogenadas adenina, citosina, guanina y timina) a lo largo de una de las cadenas del DNA, contienen la información para las proteínas específicas de un organismo. La información genética se transmite a través de un intermediario, el ácido ribonucleico mensajero (RNAm), el cual, después de pasar por un proceso de maduración, dirige la síntesis de proteínas específicas. Estas intervienen de manera directa en el desarrollo de un organismo. Tres nucleótidos sucesivos en el RNAm forman un codón. La combinación de los cuatro nucleótidos forma 64 codones distintos, los cuales especifican a veinte aminoácidos, que son los componentes principales de las proteínas. La estructura y propiedades de cada proteína están dadas por la secuencia de aminoácidos.

Durante la evolución de los organismos, los cambios genómicos pueden ser el resultado de diversos acontecimientos. Algunos de éstos incluyen cambios en los genes o en las secuencias que regulan su expresión. Por ejemplo, genes nuevos se pueden formar por duplicaciones, sustituciones, deleciones o inversiones de segmentos de genes preexistentes.

Con las nuevas técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular, ha sido posible obtener grandes cantidades de fragmentos de ADN, lo cual ha permitido aislar a los genes. De esta manera, se ha podido precisar la secuencia de los nucleótidos de una gran cantidad de genes. El análisis de estas secuencias ha mostrado dos hechos importantes. Por una parte, se observa que algunas proteínas están formadas por subestructuras llamadas dominios, las cuales, en muchos casos, son unidades estructurales y funcionales dentro de la molécula. Por otra parte, algunas proteínas con diversas funciones, de una o de diferentes especies, comparten dominios similares, lo cual tiene una enorme trascendencia desde el punto de vista evolutivo. En este contexto, un dominio se puede definir como una secuencia de nucleótidos -o de aminoácidos - que se repite en el gen o en la proteína y que se puede encontrar en otros genes o proteínas.

Cuando se quieren encontrar relaciones filogenéticas entre organismos que son muy diferentes morfológicamente, el análisis de la estructura de genes con dominios similares resulta ser muy eficaz.

DOMINIOS Y SU EVOLUCION EN GENES Y PROTEINAS

Los genes de los organismos eucariontes, a diferencia de la mayoría de los procariontes, presentan segmentos de DNA que interrumpen la secuencia portadora de la información genética. A estas secuencias intercaladas se les denomina intrones, mientras que a los segmentos de DNA informativo se les denomina exones. Uno de los pasos en el proceso de maduración del ARNm es la eliminación de intrones.

En 1978, Gilbert (1) propuso una hipótesis para la formación de genes nuevos. Según este autor, uno de los mecanismos de formación de genes nuevos es mediante la recombinación de intrones, la cual da lugar a nuevas combinaciones de exones. Este mecanismo llamado "barajeo o selección de exones" aumenta la tasa de evolución. Según esta hipótesis, los exones codifican regiones funcionales, las cuales pueden ser combinadas de manera independiente durante la evolución.

La relación entre la estructura del gen y los dominios en las proteínas aún no está muy clara. Sin embargo, los exones frecuentemente se correlacionan con dominios funcionales en las proteínas. Por ejemplo, el dominio transmembrana y la secuencia señal en las proteínas de membrana y en las extracelulares, frecuentemente, se encuentran en exones separados.

Las proteínas que participan en el proceso de coagulación de la sangre, forman un grupo particularmente interesante en el estudio de los dominios en genes y en proteínas. Estas proteínas intervienen en la regulación, la formación y la disolución de coágulos sanguíneos. El análisis de la estructura de estos genes ha mostrado que probablemente evolucionaron por el mecanismo de barajeo de exones, duplicaciones y otras modificaciones (2).

La familia de proteínas de la coagulación sanguínea presentan diversas funciones; sin embargo, varias comparten entre sí dominios funcionales. La figura 1 muestra la distribución de exones de los genes de las proteasas que intervienen en este proceso. Claramente se observa que no sólo todas ellas poseen varios dominos; sino también, comparten dominios similares. Por ejemplo, existen cuatro dominios proteínicos que presentan varias cisteínas, las cuales forman puentes disulfuro. Estos son el dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (FCE), los "dedos" del tipo I y II de la fibronectina y el dominio del tipo denominado "Kringle".

El dominio similar al FCE contiene 3 puentes disulfuro y se presenta en el activador del plasminógeno tisular (APT), la urocinasa de cerdo (uP), en los factores XII, IX, X y VII (FXII, FIX, FX y FVII) y en la proteína C (PC). Excepto en el APT, cada dominio similar al FCE está representado por un exón.

Los dedos similares al tipo I y II de la fibronectina poseen dos puentes disulfuro y alrededor de 50 y 60 aminoácidos respectivamente. Estos dominios se encuentran en el APT y el FXII. Unicamente el dedo tipo II esta contenido en un exón.

El dominio denominado "kringle" presenta 3 puentes disulfuro y alrededor de 100 aminoácidos. Algunos de los residuos internos están bien conservados. Este dominio puede estar contenido en dos exones como en el APT o en el FXII, o en un exón como en el segundo "kringle" de la protrombina (PT).

Los FIX, FX, FVII y la PC (Fig. 1) son muy similares en el número y en el tipo de exones, pero no en el tamaño de los intrones. Salvo el FVII, todos estos genes presentan ocho exones y comparten el mismo tipo de dominios en el mismo orden. Otra característica que presentan estas proteasas en común, es que los intrones de dominios similares

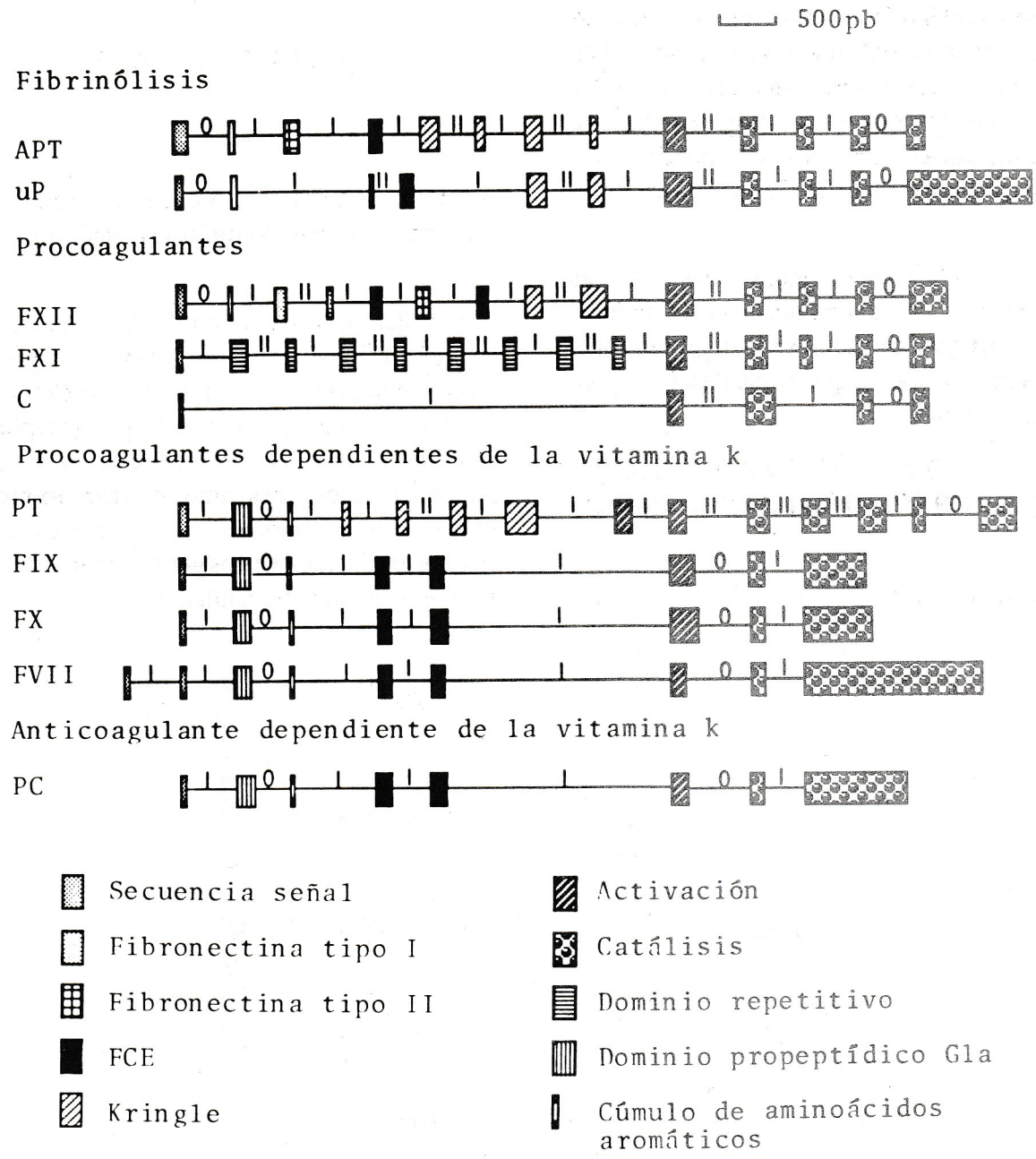


Figura 1. Organización estructural de los genes de las proteasas de coagulación de serina.
La escala representa 500 pares de bases. Cada línea horizontal con barras representa el gen de las proteínas cuya abreviatura aparece en el lado izquierdo de la figura. Las barras representan exones dibujados a escala. El tipo de dominio se indica en la parte inferior. Las líneas, que unen entre sí los exones, representan intrones que no están a escala. Los números romanos indican si el intrón está en fase I,II o cero relativa al marco de lectura (ver texto). Las abreviaturas significan: APT, activador del plasminógeno tisular; uP, urocinasa de cerdo; FXII, factor XII; FXI, factor XI; C, calicreína; PT, protrombina; FIX, factor IX; FX, factor X; FVII, factor VII y PC, proteína C. (Tomado de (9)).

muestran la misma fase relativa al marco de lectura. Es decir, si el intrón divide a los exones entre el primer y segundo nucleótido del codón, el intrón está en fase I; si el intrón los divide entre el segundo y el tercer nucleótido del codón, se dice que está en fase II. Finalmente, si el intrón divide al exón entre codones, se dice que está en fase cero. Un ejemplo son los intrones que limitan a los dominios similares al FCE, los cuales presentan fase I en ambos extremos del exón.

Se puede concluir que los genes de las proteasas que intervienen en la coagulación sanguínea, comparten una gran similitud en la organización y en la estructura, lo cual sugiere que descienden de un ancestro común.

GENES CON DOMINIOS HOMOLOGOS AL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (FCE).

El dominio similar al FCE presenta aproximadamente 38 aminoácidos con 6 cisteínas distribuídas de la siguiente forma:

$$X_4CX_4CX_5CX_8CXCX_8CX_2$$

donde C es una cisteína y X es cualquier aminoácido. La función de este dominio se desconoce.

Los genes con dominios homólogos al FCE, presentan una gran variedad de funciones. Intervienen en procesos tales como la determinación celular, el transporte mediado por receptores, el movimiento celular y la coagulación sanguínea. Algunos de estos genes cambian su expresión durante el desarrollo embrionario. La única característica que los productos de estos genes tienen en común es su localización extracelular.

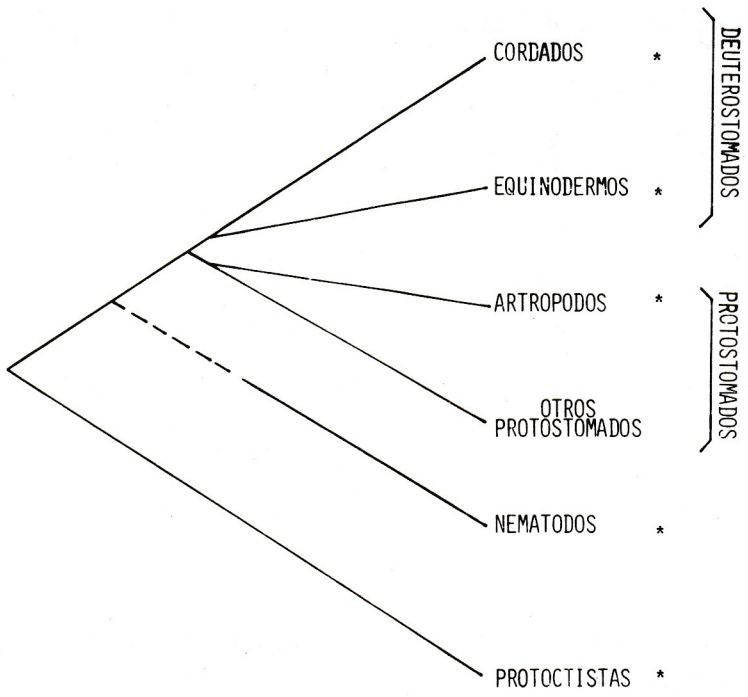


Figura 2. Arbol filogenético de algunos metazoarios y protoctistas con base en características morfológicas y moleculares.

El asterisco denota la presencia de dominios similares al FCE en los grupos indicados. La línea interrumpida en los nemátodos indica dudas en la posición de este grupo . (Tomado de (4)).

Este dominio se presenta en invertebrados, vertebrados e incluso se ha reportado en el organismo unicelular *Plasmodium falciparum* por Kaslow (en 1988 (3)). Por esta razón, se piensa que tiene un origen muy antiguo. La figura 2 muestra un árbol filogenético de algunos metazoarios y protoctistas, el cual se construyó con base en comparaciones embriológicas, morfológicas y moleculares (4). Los dominios similares al FCE se han reportado en vertebrados, equinodermos, artrópodos, nemátodos y protoctistas. Sin embargo, no se ha reportado en algunos protostomados como moluscos o anélidos.

En invertebrados se sabe de siete genes que contienen dominios similares al FCE (4). En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se ha reportado en los genes *Notch, Delta,* la subunidad B1 de la laminina y en el gen *crumbs.* En el nemátodo *Caenorhabditis elegans,* este dominio se presenta en los genes *lin-12* y *glp-1.* También se ha reportado en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* en el gen μEGF. Sin embargo, sólo se conoce la estructura de los genes *Notch, lin-12* y μEGF (4,5,6).

Estos genes intervienen en el desarrollo del embrión. *Notch* y *lin-12* codifican proteínas de membrana y contienen 36 y 13 dominios similares al FCE, respectivamente. La organización estructural de los dominios del FCE en estos genes, difiere de la que presentan los genes de las proteasas sanguíneas con dominios similares en vertebrados. En *Notch* y en *lin-12* hay exones con varios dominios homólogos al FCE hay intrones que cortan estos dominios, además de que los intrones no están en la misma fase relativa al codón (4).

TABLA I

GENES EN VERTEBRADOS CON DOMINIOS SIMILARES AL FCE

GENE	NUMERO DE DOMINIOS
*Precursor del factor de crecimiento epidérmico	10
*Receptor de la lipoproteína de baja densidad	3
*Factor IX	2
*Factor VII	2
*Factor XII	2
*Factor X	2
*Proteína C	2
*Activador del plasminógeno tisular	1
*Urocinasa de cerdo	1
Factor A transformante de crecimiento	1
Citotactina	(4)
Trombomodulina	6
Proteína S	4
Laminina B1	13
Componentes C5b, C7, C8, C9, C1s y C1r del complemento	1
Perforina	(1)
Trombospondina	5
Tenascina	(13)
Laminina A	20

*Se conoce la estructura del gen
Los números en paréntesis indican secuencia parcial

(Tomado de (9)).

En vertebrados, existen reportes de alrededor de 20 genes con dominios similares al FCE (Tabla I). En aquellos casos donde se conoce la estructura del gen, cada dominio similar al FCE está representado por un exón y los intrones presentan la misma fase relativa al marco de lectura, al igual que en las proteasas de la sangre.

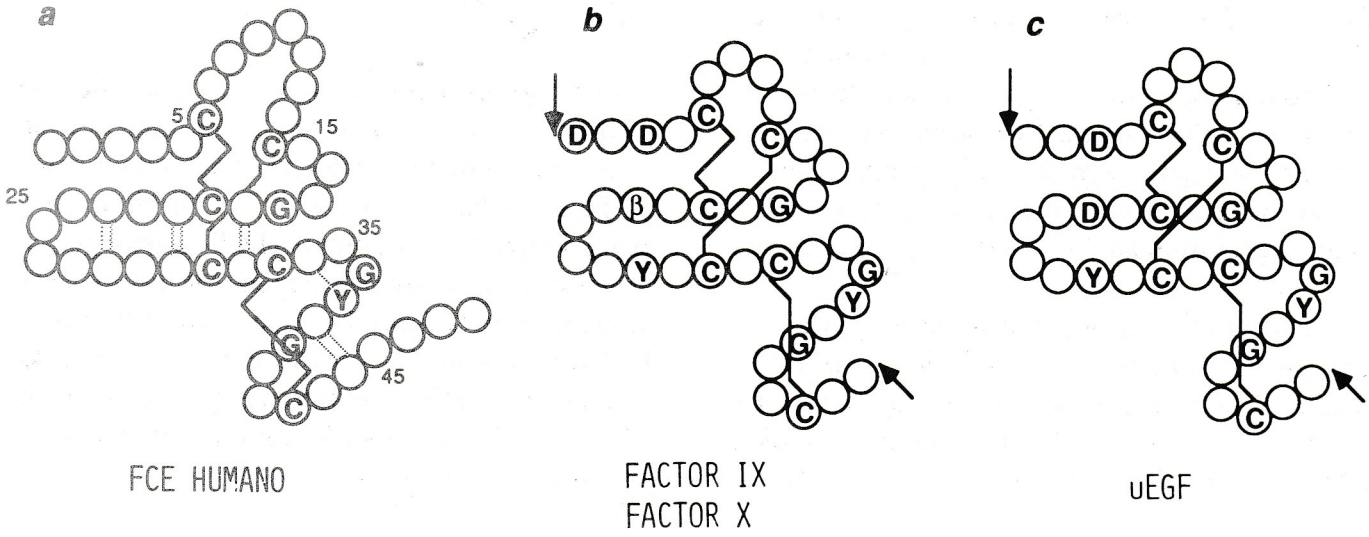


Figura 3. Diagramas de la estructura secundaria del dominio FCE.

(a) FCE en humanos, aminoácidos 1 a 48. Las líneas continuas indican puente disulfuro, las líneas punteadas denotan puentes de hidrógeno. Los residuos que se repiten son: C, cisteína; G, glicina; Y, puede ser fenilalanina o tirosina. (b) Extrapolación al primer dominio similar al FCE en el factor IX, aminoácidos 47 a 84 y al factor X, aminoácidos 46 a 83. Las flechas indican la posición de los intrones. ß es ß-hidroxiaspartato o ß-hidroxiasparagina. D es ácido aspártico. (c) Extrapolación del consenso de la secuencia de los dominios similares al FCE en el erizo de mar, (Tomado de (4)).

En la figura 3a se presenta la estructura secundaria obtenida por extrapolación de la estructura tridimensional. Por lo tanto, se sabe que este dominio tiene tres puentes disulfuro y varios puentes de hidrógeno. Se observa una gran similitud cuando se extrapola a dominios similares en los factores IX y X en humanos y al homólogo en erizos de mar (Fig. 3b y 3c), (4). También se observan varios aminoácidos que están repetidos, lo cual es un argumento en favor de la conservación de la estructura secundaria.

EL GEN μEGF EN EL ERIZO DE MAR

El descubrimiento de que el gen μDEGF en equinodermos presenta dominios similares al FCE, es de gran importancia dada la lejanía filogenética de este grupo de organismos con los vertebrados y con los otros invertebrados que muestran genes con dominios similares al FCE (7). El gen μEGF expresa dos ARNm cuya acumulación es regulada durante el desarrollo del embrión (7). Se tiene evidencia de que los dos mensajeros son el resultado de una edición diferencial (4). Aunque los mensajeros se acumulan preferencialmente en el ectodermo embrionario, las células primarias mesenquimáticas muestran también una alta acumulación de mensajeros (8). Por las razones anteriores se cree que el o los productos de este gen son importantes para el desarrollo del embrión, aunque su función se desconoce.

El gen μEGF presenta varios dominios similares al FCE, los cuales tienen el mismo número de

aminoácidos, además de que esta secuencia está muy conservada (6, 7).

La secuencia de nucleótidos de varias clonas provenientes de este gen reveló, además de los dominios similares al FCE, otros dominios encontrados en genes de otros organismos (1, 4). La figura 4 muestra los dominios peptídicos de los dos supuestos productos. En el extremo amino se encuentra una región altamente hidrofóbica llamada secuencia señal, característica de las proteínas de membrana o extracelulares.

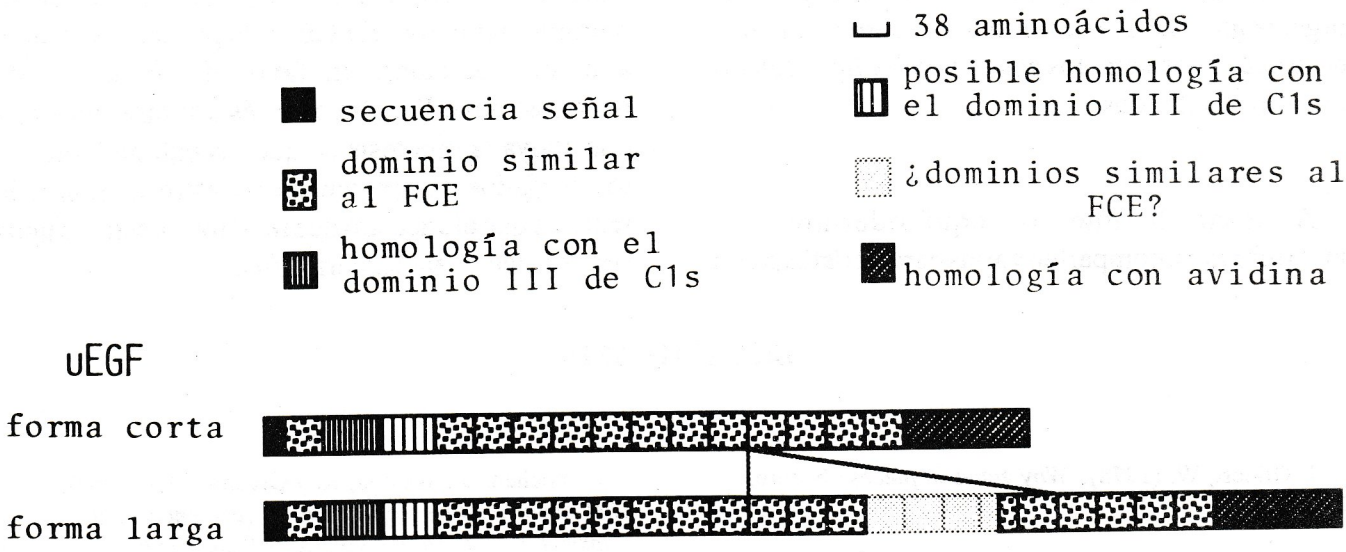


Figura 4. Dominios proteínicos en los supuestos productos del gen μEGF.
Los dominios están a escala. En la parte superior se indica el tipo de dominio. (Tomado de (4)).

Esta secuencia señal es seguida de un dominio similar al dominio III del componente C1s del complemento en humanos. Este componente es una enzima que interviene en la formación de poros en el proceso de lisis celular. Hacia el extremo carboxilo, el producto corto presenta doce dominios similares al FCE, mientras que el producto largo presenta probablemente veinte de estos dominios.

En el extremo carboxilo, ambos presentan una región homóloga a la avidina de aves y a la estreptoavidina de la bacteria *Streptomyces avidinii*. La función de estos dominios se desconoce. Unicamente se sabe que la avidina se encuentra de manera abundante en la clara de huevo y que se une a la biotina.

El gen μEGF es, pues, otro ejemplo de un gen mosaico pues presenta dominios que son compartidos por otros genes, probablemente como resultado de un "barajeo de exones" (4). Este es el primer reporte de un gen que presenta estos tres tipos de dominio.

También se analizó parcialmente la estructura del gen μEGF. Se observó que, al igual que en vertebrados, cada dominio similar al FCE está representado por un exón y los intrones que flanquean a estos dominios están en fase I. La organización de los dominios similares al FCE, las características de sus intrones y la conservación en la secuencia de exones, sugieren que μEGF probablemente evolucionó mediante duplicaciones en serie de sus exones (4).

La presencia de dominios similares al FCE en una gran cantidad de organismos invertebrados, vertebrados e incluso en un organismo unicelular son evidencias que sugieren que este dominio se originó antes de la radiación de los metazoarios. Sin embargo, la semejanza en la organización de los dominios similares al FCE en los genes de los vertebrados y en el gen μEGF sugiere que esta organizacion deriva de un ancestro común, distinta de la que dió origen a los genes *Notch* y *lin-12* en los otros invertebrados.

A pesar de que los equinodermos son invertebrados, comparten varias características con los vertebrados. Los cordados, los quetognatos, los hemicordados y los equinodermos pertenecen al grupo de los deuterostomados, debido a que comparten varias características embriológicas. Algunas de éstas incluyen el tipo de formación de la boca en la larva y la formación del mesodermo a partir del arqueterón. La comparación del gen μEGF en el erizo de mar con genes que presentan dominios similares al FCE, es la primera evidencia a nivel molecular, en favor del concepto de deuterostomía. Por otra parte, ésta es otra evidencia que apoya la hipótesis de que los equinodermos y los cordados comparten un ancestro común más reciente que el ancestro que relaciona a estos grupos con los demás metazoarios (4).

BIBLIOGRAFIA

1. Gilbert, W. (1978). *Why genes in pieces?* Nature, **271**, 501.

2. Furie, B.y Furie, B.C. (1988). *The molecular basis of blood coagulation.* Cell, **53**, 505-518.

3. Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan,J.E., McCutchan, T.F. y Miller, L.H. (1988). *A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains.* Nature, **333**, 74-76.

4. Delgadillo-Reynoso, M.G., Rollo, D.R., Hursh, D.A.y Faff, R. A. (1989). *Structural analysis of the gene μEGF in the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus reveals more similarity to vertebrate than to invertebrate genes with EGF-like repeats.* J. Mol. Evol., en revisión.

5. Kidd, S., Kelley, M.R.y Young, M.W. (1986). *Sequence of the Notch locus of Drosophila melanogaster: Relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors.* Mol Cell Biol., **16**, 3094-3108.

6. Yochem, J., Weston, K. y Greenwald, I.(1988). *TheCaenorhabditis elegans lin-12 gene encodes a transmembrane protein with overall similarity to Drosophila Notch.* Nature, **335**, 547-550.

7. Hursh, D.A., Andrews, M.E. y Raff, R.A. (1987). *A sea urchin gene encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor.* Science, **237**, 1487-1490.

8. Hursh, D.A. (1988). *Cell lineage-restricted transcripts in the development of the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus.* Tesis de Doctorado. Indiana University. Bloomington Indiana, EUA.

9. Delgadillo-Reynoso, M.G. (1988). *Structural analysis of the gene μEGF in the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus reveals more similarity to vertebrate than to invertebrate genes with EGF-like repeats.* Tesis de Maestría. Indiana University. Bloomington Indiana, EUA.

NUEVOS METODOS PARA MARCAR SEGMENTOS DE POLINUCLEOTIDOS O GENES ESPECIFICOS.

Jablonski, E., Moomaw, E.W., Tullis, R.H. y Ruth, J.L. (1986).
Preparation of Oligodeoxynucleotide-Alkaline Phosphatase Conjugates and Their Use as Hybridization Probes. Nucl. Acids. Res. 14(15): 6115-6127.

El aislamiento y la manipulación de segmentos de nucleótidos (DNA o RNA) depende, en gran medida, de los métodos de marcaje que permiten un seguimiento confiable a través de una serie de experimentos, tal como la hibridización de un gene específico con el producto de la digestión enzimática del genoma que provenga de otra fuente. Uno de los mecanismos más eficaces y comúnmente utilizados es el marcaje de dichos segmentos mediante la incorporación del radioisótopo P^{32}, el cual permite la detección posterior, al obtener un registro fotográfico de la matríz que contiene a los segmentos blanco (aquellos que servirán de prueba en la hibridización), tales como el costo, el tiempo que toma para la obtención de los resultados finales, y el riesgo implícito siempre que se manejan elementos radiactivos.

A principios de esta década se desarrollaron nuevos mecanismos para marcar segmentos de nucleótidos, los cuales no hicieron uso de isótopos radiactivos, pero sí aprovecharon características fisicoquímicas de algunas biomoléculas, tales como el acoplamiento a segmentos nucleotídicos de compuestos fluorescentes o de enzimas, de tal manera que después de un ensayo de hibridización la secuencia de interés se pudiera detectar mediante fluorescencia (bajo la irradiación de luz UV) o la actividad de alguna enzima (generalmente, con la generación de productos con color).

Dentro de los sistemas enzimáticos, los que se han ensayado con mayor frecuencia son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. Esta última es el sistema seleccionado por los autores para preparar lo que ellos denominan un conjugado- que consiste de un segmento de nucleótidos, un brazo espaciador, un activador y la enzima-, el cual evalúan frente a secuencias complementarias, para determinar la factibilidad y sensibilidad del sistema, en comparación con el marcaje con P^{32}.

Jablonski y col. ensayan cinco secuencias de nucleótidos que son complementarias a segmentos de : 1) genoma del virus de la hepatitis B (HBV), 2) genoma del virus del herpes simple (HSV), 3) genoma de *C. jejuni*, 4) el gene que codifica para una toxina termoestable de *E. coli*, y 5) el gene que codifica para una toxina termolábil de *E. coli*. Además, como referencia utilizan DNA de placenta humana y de esperma del arenque. Sintetizan los cinco segmentos mencionados en un sintetizador automático, en donde adicionan directamente el brazo espaciador (3'-fosforamidita) para obtener el oligómero, el cual es purificado posteriormente. De manera similar obtienen los segmentos marcados radiactivamente, pero incorporando P^{32}-ATP a un sistema de nucleótido cinasa del fago T4. Posteriormente, se activa el oligómero con el brazo espaciador mediante la adición de DSS (suberato de disuccinimidilo) en dimetil sulfóxido durante 5 minutos a temperatura ambiente, y ya activado lo purifican a través de una columna de Sephadex G-25, para posteriormente acoplarlo a la fosfatasa alcalina en el amortiguador apropiado durante 16 horas a temperatura ambiente. Se purifica el conjugado resultante (con un cociente 260/280 igual a 1.2) mediante filtración en Bio-Rad P100, y posteriormente en DEAE-Celulosa (en rendimiento final es del 30 al 50% a partir del material inicial), el cual se puede almacenar con azida de sodio al 0.5% a 4°C.

Por otro lado, los autores fijan a filtros de nitrocelulosa y membranas de nylon diluciones seriadas de cada uno de los 5 segmentos de muestra (DNA blanco), para posteriormente hibridizarlos con los conjugados correspondientes (y los segmentos con P^{32}, según el ensayo), durante un período de 15 a 30 minutos a 50°C. Después del lavado, se incubaron los filtros con la mezcla de reacción (hasta por 4 horas) para detectar la actividad de la fosfatasa alcalina mediante la hidrólisis del fosfato de p-nitrofenilo; los filtros que se ensayaron con los segmentos marcados con P^{32} se expusieron a una placa fotográfica durante 4 y 18 horas a -80°C. De manera paralela los autores corren ensayos con los DNA de referencia.

Jablonski y col. reportan que después de los ensayos de hibridización, la detección de segmentos mediante el marcaje con la enzima resultó cinco veces más sensible (10 pg) que la detección con P^{32}, y que la hibridización de cada conjugado fue específica para cada una de sus secuencias complementarias, es decir, no observan hibridización con los DNA de referencia. Además, después del tratamiento, la fosfatasa alcalina retuvo el 100% de su actividad (400 a 500 U/mg).

Los autores presentan una serie de ventajas adicionales del método. La enzima fosfatasa alcalina no reacciona con los componentes del filtro de nitrocelulosa, por lo que no genera fondo (background) que interfiera con la resolución de las bandas. Se puede recuperar el conjugado de los hibridos mediante el tratamiento de los filtros con amortiguadores de baja fuerza iónica, conservando su actividad. La fosfatasa alcalina es una enzima estable, resistente a temperaturas altas y al SDS. Se completan los ensayos en lapsos de tiempo relativamente cortos (de 2 a 5 horas). Las pruebas se pueden elaborar en lugares fuera del laboratorio sin la necesidad de equipo sofisticado.

Finalmente, y aunque no se ha hecho una evaluación detallada al respecto, los costos que implica el uso de esta técnica deben estar muy por debajo de aquellos que resulten del marcaje con isótopos radioactivos, lo cual es una gran ventaja bajo nuestra situación. Seguramente durante estos años mejorarán estas técnicas y serán de un mayor uso común.

Raúl Arredondo Peter
Lab. Bioq. Microbiana,
Esc. Nal. Ciencias Biológicas, IPN

Elia Pedroza Jurado
Lab. Inmunol., Ctro. Inv. Ecol. Sureste

DEL BUEN DECIR... 1

Iniciamos en este número del *Boletín de Educación Bioquímica* una columna elaborada por la Comisión de Defensa del Lenguaje Bioquímico, que será numerada sucesivamente para facilitar la correspondencia con nuestros lectores. Desde este momento invitamos a investigadores, profesores y estudiantes graduados de todas las áreas de la Bioquímica a enviarnos sus preguntas y comentarios, con la seguridad de que serán respondidos. Cada columna tratará de corregir 5 errores comunes de nuestra jerga profesional y propondrá neologismos cuando sea necesario.

1. ABSORBENCIA (acción de absorber). Por contaminación del inglés *absorbance, absorbancy*), se usa incorrectamente "absorbancia".

2. ESCISION Y EMPALME. Este es el proceso de maduración del ARN, que en inglés se denomina *scission* (del latín tardío *scissio*) and *splicing* (del holandés *splissen, splitsen*). Como se trata de un término de marinería, se ha sustituido *splicing* por su equivalente en español, empalme.

3. GEN (del latín *genus*). Por contaminación de

la escritura en inglés *gene,* se escribe y se pronuncia actualmente "gene". Debe decirse: un gen, dos genes.

4. MATRIZ (o MOLDE). En lugar de "templado" o "templete", derivados por contaminación del inglés *template.*

5. ORGANULO del latín *organum*, y éste del griego *organon* + el sufijo diminutivo latino *-ulo*). Proponemos este neologismo sumamente necesario, en sustitución de "organito", "organelo" y "organillo", utilizados en la actualidad, por analogía con célula, gránulo, párvulo,óvulo, homúnculo, libélula.

Nota. Aparecerá siempre en primer lugar el uso correcto de una palabra en mayúsculas, y el uso incorrecto actual entrecomillado. La correspondencia puede ser dirigida a Yolanda Saldaña, A.P. 70-381, México, D.F. 04510.

COMENTARIO: CINCO PREGUNTAS SOBRE BIOLOGIA CELULAR

León Cázares, J.M. (1987).
Bol. Educ. Bioq. **6**(2): 39-47.

Cuando pensamos en alguna disciplina de la biología, normalmente nos concretamos a tratar de entender y admirar el desarrollo presente, sobre todo cuando se trata de disciplinas con mucho renombre (p. ej. la ingeniería genética), y muy pocas veces pensamos acerca del proceso histórico que le dió lugar, o más aún, cuáles pudieran ser sus perspectivas a futuro.

En este trabajo, el Dr. J.M. León-Cázares nos ubica, aunque de manera breve, en los inicios de la biología celular y nos muestra cuál ha sido su evolución, particularmente en las últimas décadas, donde se ha visto enriquecida por los principios fundamentales y los grandes avances que se han dado en muchas otras disciplinas, las cuales, a su vez, se han retroalimentado por la biología celular. Efectivamente, como cita en su trabajo, "el concepto es más importante que el método,... las técnicas son los sirvientes de las ideas", sin embargo, debemos hacer notar que los conceptos y las ideas han cambiado gracias, en buena parte, al avance que se ha dado en los métodos y las técnicas.

Tal vez la biología celular sufrió uno de sus cambios más importantes, al tratar de explicar sus conceptos morfológicos mediante la función de sus estructuras, lo que abrió paso a lo que sería el inicio de una estrecha interrelación con la bioquímica, la biofísica, la genética, etc., y posteriormente, con disciplinas que aparentemente no tendrían ningún vínculo con ella, tales como la ecología y la evolución; inclusive, actualmente hay quienes hablan de ecología celular (véase a Welch, G.R. 1987. The Living Cell as a Ecosystem. TREE. 2(10): 305-309).

Finalmente, el Dr. León-Cázares nos muestra el estado actual de la biología celular, y a su vez nos da un ejemplo muy ilustrativo de lo que podemos esperar para el futuro, al mencionarnos cómo actualmente, por medio de la resonancia magnética nuclear (RMN), es posible estudiar aspectos relacionados con el metabolismo celular in vivo e in situ, invitándonos a reflexionar al respecto.

Raúl Arredondo Peter
Comentarista.
Lab. Bioquímica Microbiana
Esc. Nal. Ciencias Biológicas
IPN

CARTA A LOS EDITORES

En nuestro país se edita un número muy reducido de revistas científicas, y dentro del campo de la bioquímica, el Boletín de Educación Bioquímica (BEB) es el único espacio que tenemos aquellos que, de alguna manera, estamos relacionados con la especialidad, para difundir tópicos de interés que no sean las revistas de circulación internacional, y por supuesto, editadas en otros países.

A pesar de las serias restriccines económicas en las que hemos vivido en los últimos años, el BEB ha podido salir adelante gracias al esfuerzo constante del grupo de entusiastas que lo dirigen, y aún cuando, debido a razones presupuestales ha habido momentos en que su atraso temporal ha sido enorme, bajo las mismas circunstancias estamos a punto de tener en unos meses más al corriente la revista, ¡enhorabuena por el comité editorial! Ello nos estimula para continuar participando e invitar a otros para que hagan lo mismo en las diferentes secciones de la revista, ya sea con artículos de revisión, comentarios a trabajos de interés general, sugerencias, comunicaciones, etc.

Pensamos que gracias al BEB tenemos la oportunidad de obtener información actualizada en tópicos que, muchas veces, no están relacionados directamente con nuestro campo de trabajo; mucha de esta información es de gran importancia para aquellos que están vinculados con actividades docentes, y además, es una vía para enterarse de qué colegas son especialistas en determinadas áreas, o cuáles son los campos de trabajo más importantes que se desarrollan en una u otra institución.

La revista se distribuye a más de un millar de estudiantes, profesores e investigadores; de ello es de esperarse una participación más activa en lo futuro. Es cierto, todos tenemos innumerables responsabilidades, pero el esfuerzo bien vale la pena.

Raúl Arredondo Peter
Lab. Bioquímica Microbiana
Esc. Nal. CienciasBio., IPN

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 artículo deberá enviarse capturado en cualesquiera de los procesadores de texto "Word" o "Wordstar", sin ningún formato, con el texto cargado a la izquierda y con una extensión máxima de 18 mil caracteres, en un disco flexible de 5 1/4 pulgadas de 365 KB. El disco deberá ir acompañado de dos impresiones del artículo en el que deberán marcarse en color las palabras o líneas que deben ir en cursivas o negritas, así como todas aquellas anotaciones que desee. En el caso de no tener acceso a estos procesadores de texto, el manuscrito podrá enviarse a máquina, no debe exceder de 12 cuartillas escritas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por renglón).

2) Se aceptarán como máximo 6 figuras o tablas, las cuales se entregarán por separado en papel albanene con tinta o como fotografía brillantes a blanco y negro. La limitación en el número de figuras, tablas y referencias obliga a los autores a que seleccionen aquéllas realmente importantes e informativas. Numere las figuras con números arábigos y las tablas con números romanos. Adicione las leyendas y pies de figura 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 y números más pequeños no deben ser menores a los 2 mm.

3) Sugerimos un máximo de 10 referencias tanto específicas como lecturas recomendadas, numeradas en el texto en forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada referencia debe contener: nombres(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) Larkins, B. A., Pearlmutter, N. L. y Hurman, W. J. (1979). The machanism of zein synthesis and deposition in protein bodies of maize endosperm. En The Plant Seed. Development, Preservation, and Germination, Editores: Rubenstein, I., Phillips, R. L., Green, C. E. y Gengenbach, B. G. Academic Press. New York. pp. 49-55

b) Miller, C. O. (1982). Cytokinin Modification of Mitochondrial Fuction. Plant Physiol, 69. 1274-1277.

5) 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 explícita.

3) El artículo deberá enviarse capturado en cualesquiera de los procesadores de texto "Word" o "Wordstar", sin ningún formato, con el texto cargado a la izquierda y con una extensión máxima de 6 mil caracteres, en un disco flexible de 5 1/4 pulgadas de 365 KB. El disco deberá ir acompañado de dos impresiones del artículo en el que deberán marcarse en color las palabras o líneas que deben ir en cursivas o negritas, así como todas aquellas anotaciones que desee. En el caso de no tener acceso a estos procesadores de texto, el manuscrito podrá enviarse a máquina, no debe exceder de 12 cuartillas escritas 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 las dos copias de los manuscritos a la Dra. Yolanda Saldaña de Delgadillo. Boletín de Educación Bioquímica, Apdo. Postal 70-381. 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., a través del corresponsal del BEB en su localidad.