

VOL. 9

No. 1

MARZO 1990

## EDITORIAL

### LA FORMACION DE RECURSOS HUMANOS EN BIOTECNOLOGIA

La biotecnología es una actividad multidisciplinaria, cuyos orígenes se remontan a la adopción de la vida sedentaria por parte de algunos grupos humanos, quienes elaboraron entonces productos fermentados como queso, pan y vino. Miles de años después, hacia mediados de este siglo, el descubrimiento de la penicilina y la producción de antibióticos por la vía fermentativa en gran escala marcan el inicio de la segunda etapa biotecnológica. En la década de los setentas, la introducción de los métodos de recombinación de ácidos nucleicos, de la producción de hibridomas y de cultivos celulares, constituyen la tercera generación en biotecnología.

La biotecnología moderna representa, para muchos autores, la posibilidad de una nueva revolución tecnológica, comparable a las que se presentaron con la introducción del uso de la energía nuclear o de la cibernética. Sin embargo, a diferencia de estas dos, la biotecnología está más al alcance de países no industrializados, ya que no se requiere de una infraestructura material tan compleja para desarrollar, con éxito, diversos procesos. Se requiere, en cambio, de suficiente

personal preparado para detectar oportunidades y resolver problemas. Países como México están ante la oportunidad de generar desarrollos biotecnológicos en áreas prioritarias como alimentación, salud, energía y medio ambiente. Si bien es imposible pensar en resolver todos los problemas con tecnologías propias, es factible pensar en la selección de áreas estratégicas para el desarrollo de las mismas.

Los recursos humanos calificados son necesarios no sólo para la generación de nuevas tecnologías, sino incluso para la adaptación de las que se adquieren en el exterior. En México es patente la insuficiencia de personal preparado para llevar a cabo estas tareas, particularmente en los aspectos de ingeniería, en todas sus ramas. En biotecnología, un gran problema que hay que resolver en el diseño curricular es el concepto de la misma que se va a utilizar. Hasta hace unos años era prácticamente sinónimo de tecnología de fermentaciones. En la actualidad se entiende por biotecnología, no sólo la producción de bienes o servicios por medio de la utilización de organismos vivos o sus partes, sino también la

Pasa a la pág. 3

## COMITE EDITORIAL

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

**GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL**  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Instituto Politécnico Nacional

**ALBERTO HAMABATA NISHIMUTA**  
Centro de Investigación y Estudios Avanzados  
Instituto Politécnico Nacional

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

**CARLOS LARRALDE RANGEL**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México

**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

**EDITORES ASOCIADOS**  
**ALICIA CEA BONILLA**  
**GUILLERMO ALVAREZ LLERA**  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México

**ASISTENTE EDITORIAL**  
**ELISA MORA**  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México

## INDICE

**BEB 90 Vol. 9 Núm. 1 Marzo 1990**

## EDITORIAL

LA FORMACION DE RECURSOS  
HUMANOS EN BIOTECNOLOGIA..... 1

## ARTICULOS

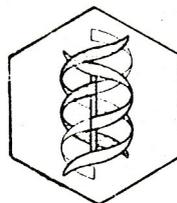
LECTINAS  
Ma. Dolorés García Suárez, \*Héctor Serrano.....4

DETERMINACION DE UNA ACTIVIDAD  
ENZIMATICA: ELECCION DE METODOS  
ALTERNATIVOS Y NECESIDAD DE CONTROLES.  
Antonio Liras..... 8

## OTRAS COMUNICACIONES

DEL BUEN DECIR... (3)  
Comisión de Defensa del Lenguaje Bioquímico,  
Sociedad Mexicana de Bioquímica.....14

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES  
DEL BOLETIN DE EDUCACION  
BIOQUIMICA.....16



Asociación Mexicana de  
Profesores de Bioquímica, A.C.



Facultad de Medicina,  
UNAM

**BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB)**, publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C.P. 04510 México, D. F.  
Tiraje 1,300 ejemplares.

## LA FORMACION DE...

propia modificación de los organismos para llegar a la generación de metabolitos o procesos. Esto implica que la biotecnología cubre una gama muy amplia de disciplinas y permite distinguir áreas claramente, como biotecnología vegetal, animal, microbiana y otras. Se requieren, entonces de conocimientos en áreas como la genética, la bioquímica y la fisiología para llevar a cabo el trabajo a nivel de laboratorio. Según el área de estudio, los conocimientos de ingeniería para llevar a cabo el proceso de escalamiento y de economía para realizar los estudios de factibilidad. No deben olvidarse conocimientos de legislación. El estudiante debe adquirir elementos de todos estos campos para evaluar la trascendencia de un proyecto.

La biotecnología pues, no es una ciencia, sino una actividad multidisciplinaria. La disyuntiva que se presenta para la formación de biotecnólogos es el proporcionar elementos de todas las áreas del conocimiento requeridas, quizás con algunos elementos de especialización, o el formar bioquímicos, microbiólogos, fisiólogos de vegetales o ingenieros, con disposición a participar en la interacción de equipos multidisciplinarios. La primera opción es la que ha sido adoptada por la mayoría de las instituciones educativas, tanto a nivel nacional como internacional. En ella se requiere de la vinculación constante con expertos en varias disciplinas durante todo el proceso de formación. Esto puede resultar difícil para algunas instituciones educativas.

México cuenta con una tradición importante en la formación de recursos humanos en las áreas médico-biológicas. Esta puede ser aprovechada en la formación de biotecnólogos. La formación de ingenieros y especialistas en diseños de equipo e instrumentos debe fomentarse, desde el nivel de licenciatura. Probablemente, el escaso número

de profesionales en estas áreas se deba a las deficiencias en la enseñanza de las matemáticas a niveles educativos inferiores. Aquí puede señalarse que los varios expertos internacionales han considerado que la formación de los biotecnólogos debe iniciarse cuanto antes, por lo que deben proporcionarse elementos en los planes de estudio, al menos desde la enseñanza media.

En el país debe determinarse la necesidad de formación de recursos humanos con nivel de licenciatura y con el de posgrado. En la actualidad, no existen sino proyectos de licenciaturas específicas en biotecnología y de técnicos a nivel medio. En cambio, sí existen en varios centros educativos, licenciaturas en ingeniería bioquímica, que capacitan al estudiante en tecnología de fermentaciones.

La preparación de expertos en biotecnología de tercera generación sólo se realiza con estudios de posgrado. Tanto a nivel nacional como mundial, la mayor parte de los programas de educación específicos en biotecnología corresponden al nivel de posgrado; en México existen por lo menos seis, la mayoría centrados en bioingeniería y tecnología de fermentaciones. Si bien, con el paso de los años se ha incrementado el número de programas de posgrado, no ha crecido proporcionalmente el número de estudiantes. Este fenómeno se presenta en general en el posgrado en México y parece provenir de la necesidad de ingresos propios por parte del egresado de licenciatura, debido a la situación económica imperante. Las condiciones de vida del estudiante de posgrado no son del todo fáciles: becas insuficientes, falta de condiciones de trabajo debido al cada vez menor gasto en investigación científica y tecnológica, etc. Aunque el mercado de trabajo para los egresados de posgrado es amplio, no existe una compensación salarial acorde a la inversión realizada al hacer los estudios, ya que para el sector industrial la experiencia resulta más importante que el grado o el título profesional.

Pasa a la 4

Viene de la 3

## LA FORMACION DE...

Esto redundará en una baja eficiencia terminal. Por su parte, en el sector académico sí hay una demanda cada vez mayor por personal con grado y existen numerosas plazas en los estados de la República, pero este sector ha sido de los más golpeados por la crisis y los egresados de posgrado prefieren la industria. Los centros educativos se ven en dificultades para retener al personal que acaban de formar. Esto puede ser grave, toda vez que los centros de educación superior e investigación han sido hasta ahora los generadores de los pocos procesos y desarrollos tecnológicos en el área. Deben renovar y fortalecer su planta de investigadores para proseguir con esta tarea y continuar, a la vez, la formación de recursos humanos capacitados.

El momento actual es particularmente crítico para el país. La apertura comercial motivada por la entrada al Acuerdo General sobre Aranceles y Comercio, la presión que representa la entrada en vigor de la nueva Ley de Patentes y Marcas, entre otros factores, hacen que las industrias establecidas en el país deban mejorar su competitividad. Esto se logra en parte con el fomento de la investigación y desarrollo al interior de las mismas. Para ello, será imprescindible contar con personal calificado. La vinculación y retroalimentación entre los centros educativos y productivos será un elemento clave para el desarrollo del país, particularmente en las áreas de incidencia de la biotecnología.

*Amelia Farrés*

Coordinadora del Proyecto Académico.  
Especialización, maestría y doctorado en biotecnología.  
UNAM

## LECTINAS

Ma. Dolores García Suárez y \*Héctor Serrano, Deptos. Biología y \*Ciencias de la Salud,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México 09340, D.F.

### RESUMEN

Con muchos de los descubrimientos en Biología, y en particular en Bioquímica, los primeros estudios sobre las lectinas no fueron el resultado de una elaboración larga y sistematizada, sino que en realidad resultaron de la agudeza intelectual de Hermann Stillmark quien, al estudiar la toxicidad de los extractos de *Ricinus communis*, observó que tenían la capacidad de aglutinar eritrocitos humanos (1).

El estudio de Stillmark probablemente fue consecuencia del azar, sin embargo, motivó que se iniciaran estudios sobre sustancias tóxicas capaces de aglutinar eritrocitos, de tal manera que H. Hellin, un estudiante, encontró que el extracto de *Abrus precatorius* tenía también la capacidad de aglutinar eritrocitos.

El hecho de que estos extractos pudieran aglutinar células de humanos llamó la atención de la gente que estudiaba un proceso similar por medio de sueros. Quizás el más intrigado fue Paul Ehrlich, reconocido como una de las autoridades en las reacciones específicas de los antisueros. A Ehrlich se debe el diseño de varias técnicas serológicas que aún son utilizadas en la actualidad. Varios de los aportes de Ehrlich a la Inmunología los hizo con extractos crudos de *Ricinus* y *Abrus*. Entre sus aportes se pueden destacar los siguientes:

a) TOLERANCIA: un animal puede resistir la acción tóxica del extracto si se le inoculan pequeñas cantidades de éste con cierta periodicidad.

b) ESPECIFICIDAD: el suero de animales

inmunizados con extractos de *Ricinus* inhibe la acción de este tipo de extracto pero no del de *Abrus*, al igual que el suero anti-*Abrus* no protege de la acción de extracto de *Ricinus*.

c) TRANSPORTE DE ANTICUERPOS A TRAVES DE PLACENTA: si el extracto es inoculado en hembras preñadas, los productos de éstas resisten la acción del extracto.

d) SECRECION: las crías provenientes de hembras no inmunizadas con el extracto pueden resistir su acción si son amamantadas o alimentadas con leche proveniente de hembras a las que se les inyectó el extracto.

Sin embargo, el estudio de las lectinas no progresó más allá de ser una curiosidad por sus efectos tóxicos. No fue sino hasta la década de los años 40 cuando se amplió el campo de las lectinas. Los estudios independientes de W. C. Boyd y K.O. Renkonen establecieron que los extractos proteicos de algunos vegetales como el frijol *Phaseolus limensis* tenían la capacidad de aglutinar específicamente eritrocitos humanos del tipo sanguíneo A, mientras que el extracto de las semillas de *Lotus* aglutinaban los de tipo sanguíneo O, pero no los de personas con sangre tipo A.

El primer nombre que recibieron este tipo de macromoléculas fue el de fitohemoaglutininas, una palabra compleja que trataba de indicar las características conocidas hasta la primera mitad de este siglo: su origen y lo que sucede cuando se les pone en contacto con la sangre. Ciertamente, proliferaron los reportes en donde se indicaba la purificación de una nueva fitohemoaglutinina. Boyd y Shapleigh, propusieron que se les denominara lectinas (del Latin *lego* = escoger), basándose en la capacidad que tenían de aglutinar específicamente eritrocitos de algún tipo sanguíneo (2).

Al mismo tiempo que se abría el campo de las lectinas, la Inmunología había recopilado una gran cantidad de conocimientos. De hecho, estaba finalizando la primera "época de oro" de la Inmunología. Dentro de los problemas que no podía explicar estaba el hecho de que, al tomar algunas secreciones de organismos animales a los

cuales no les habían sido inoculados eritrocitos de humanos o no presentaban una respuesta inmune, también se podía obtener una hemoaglutinación. El término *lectina* también se les aplicó a estas secreciones, con lo que la definición de éste sufrió algunas modificaciones pasando de ser "*extractos vegetales que tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de un cierto tipo sanguíneo*" a "*proteínas de origen no inmune capaces de unirse a carbohidratos y aglutinar células. Estas proteínas pueden provenir de animales, de vegetales o de microorganismos y pueden (no necesariamente) discriminar entre diferentes tipos sanguíneos*" (1,3).

Esta definición trata de agrupar algunas características comunes que se conocen en la actualidad para la mayoría de las lectinas. Por ejemplo, la aglutinación provocada por la lectina de *P. limensis* se puede inhibir por medio de una solución que contenga N-acetil-D-galactosamina, mientras que la presencia de la L-fucosa inhibe la aglutinación provocada por la lectina de semillas de loto; podemos afirmar que en la superficie de los eritrocitos de personas que pertenecen al grupo sanguíneo A, se encuentran glucoproteínas o glucolípidos que presentan residuos de N-acetil D-galactosamina; mientras que los de las personas con tipo sanguíneo O tienen L-fucosa. La lectina de semilla de loto reconoce a la L-fucosa mientras que la de frijol reconoce a la N-acetil D-galactosamina, lo que demuestra que la aglutinación puede ser inhibida por azúcares simples y que son los residuos de carbohidratos en la superficie celular, los blancos reconocidos por las lectinas (4).

Dos acontecimientos marcan el impacto de las lectinas que acrecentaron aún más el interés de los investigadores por estas moléculas: a) el hecho de que estas macromoléculas tengan la capacidad de unirse preferencialmente a células tumorales (5); b) la capacidad que tienen las lectinas de inducir la división celular.

Los diversos estudios histoquímicos han demostrado una de las características principales de las células tumorales: la expresión de determinantes antigénicos propios que, en algunos casos, semejan o aún son idénticos a los que se pueden encontrar en organismos en estado embrionario. Las lectinas de

*Ricinus comunis* y de *Abrus precatorius* tienen la capacidad de reconocer compuestos que contengan residuos de azúcares en la superficie de diversos tipos de células tumorales. La importancia de las lectinas en este tipo de estudios se ha tratado de extender a trabajos con fines terapéuticos. Desafortunadamente, cuando se utilizan mezclas de estirpes y líneas celulares, las lectinas también se unen con algunas estirpes, sobre todo si provienen de organismos jóvenes, por lo que el componente tóxico (toxina, fármaco o radioisótopo) es internalizado tanto por las células tumorales como por las normales, lo que disminuye la utilidad de estas "armas específicas".

La capacidad mitogénica de las lectinas y en particular, de dos de ellas, la fitohemoaglutinina (FHA) y la concanavalina A (Con A), ha sido ampliamente explotada, ya que con ellas se han podido hacer cultivos de sangre periférica completa, en que se estimula específicamente a un tipo de células: los linfocitos T. Este tipo de estudios tienen gran impacto citogenético, en los que se requiere una mínima cantidad de sangre para poder obtener una cantidad considerable de células, poder analizar directamente el material genético en cromosomas y observar en ellos cambios cuantitativos o cualitativos.

Como es natural, al requerirse mayor cantidad de reactivos purificados, los métodos utilizados van siendo más exactos y a la vez que brindan mayor información acerca de las características básicas del material purificado, toman algunas de ellas para poder desarrollar métodos más eficientes. Obviamente, el campo de las lectinas no ha sido la excepción ya que, si bien Stillmark trabajó con extractos crudos hechos por él mismo, Aub y colaboradores lo hicieron con "lipasas purificadas" comercialmente. Al tomar en cuenta la unión específica de las lectinas a los monosacáridos, Inbar y Sachs (6) utilizaron un método para purificar cantidades apreciables de Con-A, para poder utilizarla en sus estudios de topografía de células transformadas. Los métodos más utilizados en la actualidad para purificar lectinas, son por cromatografía de afinidad, en donde se une a un soporte insoluble el monosacárido que reconoce la lectina. Después de colocar y lavar el extracto

clarificado de la semilla o de la fuente de extracción, se eluye la lectina con una solución que contenga al monosacárido específico. En el caso de la Con-A, se utiliza su capacidad de unirse al Dextrán para ser eluída con D-glucosa.

Esta facilidad para la purificación, ha permitido que la Con A sea la lectina más estudiada. La Con-A fue la primera lectina cuya secuencia de aminoácidos se conoció y la primera de la que se hicieron modelos tridimensionales de su estructura. También se conocen detalles de la estructura tridimensional de otras lectinas, que han proporcionado una alternativa para establecer correlaciones entre la estructura y la especificidad. La mayoría de los datos estructurales han sido aportados por los resultados obtenidos con la difracción de rayos X de alta resolución.

Los datos de las estructuras primarias de la Con-A, ricina y de la lectina de semilla de haba muestran un alto grado de homología. También a nivel de síntesis proteica, la Con A ha mostrado un procesamiento diferente al que se presenta en la mayoría de las proteínas: una vez sintetizada la porción proteica, un rearrreglo interno permite la formación de enlaces peptídicos.

En muy pocos casos se conoce la función de las lectinas en la naturaleza. También en este campo, las pocas lectinas cuya función se conoce, provienen de estudios diseñados para explicar otro fenómeno y que recurren a postular una "función semejante a lectina" como hipótesis alterna. Tal es el caso de la proteína de hepatocitos que une D-galactosa específicamente y cuya función es la remoción de glucoproteínas del torrente sanguíneo (7). Otro caso es el de una proteína que une manosa 6-fosfato y que actúa durante el procesamiento intracelular que dirige el empaquetamiento de enzimas lisosomales. Finalmente, en estudios sobre los fenómenos iniciales de infecciones causadas por *E. coli*, se encontró que, en los *pili* o en los *fimbriae* de esta enterobacteria, hay una glucoproteína que une específicamente D-manosa (8).

Varios estudios recientes han mostrado que algunas lectinas "clásicas", como la discoidina I, presentan además de su alta especificidad para N-

acetil D-galactosamina, un sitio adicional mediante el cual permiten que *Dictyostelium discoideum* pueda pasar de un estado ameboide de vida libre a su estado de agregación para formar el cuerpo fructífero, que es la etapa reproductiva de este hongo. Esta agregación está mediada por receptores en la superficie celular. Al analizar la secuencia primaria de este segundo sitio de la discoidina I, se observó que contenía la secuencia arginil-glicil-aspartil (RGD), que es característica de moléculas que permiten la adherencia de células animales a sustratos como la colágena: las integrinas.

Podría parecer que la discoidina I es la excepción, sin embargo, la lista de excepciones se alarga cada vez más. El receptor de manosa 6-fosfato de la superficie celular en las células de Kupfer tiene la capacidad de unir al factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF II); la interacción de la elastina y su receptor para formar fibras elásticas en condroblastos se altera, cuando se le agrega lactosa al medio en donde se encuentran.

Una de las razones por las cuales el término lectina es cada vez más difícil de definir se debe a que algunas de ellas presentan dos o más dominios funcionales. En algunos casos, se requiere la presencia de, al menos, dos dominios para poder explicar claramente la función de una determinada lectina. Tal es el caso del receptor a las asialoglucoproteínas de los hepatocitos. Este receptor permite la remoción de proteínas séricas que presentan residuos terminales de galactosa. La remoción de las glucoproteínas se lleva a cabo mediante un proceso endocítico. Para poder llevar a cabo esta función, es necesario que el receptor presente un dominio hidrofóbico, que le permita anclarse en la membrana del hepatocito (9).

De la misma manera que en el caso del receptor a las asialoglucoproteínas del hepatocito, muchas otras proteínas han mostrado su capacidad de unir carbohidratos en un dominio particular, mientras en otro dominio se puede ejercer otra función. En el caso de la acrosina, se ha mostrado su capacidad de unir oligosacáridos que contienen L-fucosa o galactosa en un dominio completamente separado del sitio activo por donde esta enzima hidroliza los componentes de la zona pelúcida, lo que permite el

paso del espermatozoide en la fecundación del ovocito. Aún más, se ha demostrado que en la acrosina existe un tercer dominio hidrofóbico que le permite anclarse a la membrana acrosomal.

Por los estudios sobre la estructura de las lectinas y, en especial, de las lectinas que como la acrosina forman parte de alguna membrana, se sabe que están compuestas de tres dominios básicos: un dominio hidrofílico que se orienta hacia el citoplasma, un dominio hidrofóbico que le permite anclarse en la membrana como parte integral de ella, y un dominio extracelular, también hidrofílico, en donde se encuentra el sitio de reconocimiento del carbohidrato. En este tipo de lectinas existe un alto porcentaje de homología entre las que unen fucosa o galactosa (como la acrosina y el receptor a las asialoglucoproteínas) y entre aquellas que unen manosa (como el receptor a manosa 6-fosfato y el receptor a manosa de las células de Kupfer), pero no entre ambos tipos de especificidad (10).

Aún y cuando se han estudiado por más de una centuria el campo de las lectinas todavía tiene la belleza y la atracción de lo desconocido. A través de esta revisión, hemos tratado de mostrar cómo una curiosidad de laboratorio ha ampliado el campo del conocimiento y ha tenido impacto, no sólo en la investigación, sino en la industria y que a lo largo de su historia nos ha mostrado caras muy diferentes de un mismo fenómeno. El campo de las lectinas se hace cada vez más amplio ya que, al responder una pequeña fracción de una pregunta, saltan interrogantes nuevas y apasionantes.

En la actualidad aún la misma definición del término es tema de controversia ya que, algunos autores consideran que debe redefinirse para permitir la inclusión de todas las **"proteínas que unen carbohidratos y que sean diferentes de las enzimas (que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos) o anticuerpos"** (11), otros autores consideran que esta redefinición debe implicar **"subdivisiones posteriores para incluir características comunes acerca de la especificidad, función y distribución en la célula o en un tejido"** (10).

La potencialidad de las lectinas para ser utilizadas

como agentes terapéuticos apenas está tomando forma, lo mismo que el campo de la evolución de la especificidad y las características del sitio de unión al carbohidrato. La función natural de las lectinas es un campo apenas tocado, del que aún sólo vemos

la lejana luz que se nos proyecta. En suma, el estudio de las lectinas a pesar de tener poco más de un siglo, sigue siendo tan desconocido, deslumbrante y promisorio como si apenas se estuviera abriendo para nosotros.

## REFERENCIAS

1. Lis, H., Sharon, N. (1986): *Lectins as molecules and as tools*. Ann. Rev. Biochem. 55: 35-68.
2. Boyd, W.C., Shapleigh, E. (1954): *Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins)*. Science 119: 419.
3. Sharon, N. y Lis, H. (1972): *Lectins: cell agglutinating and sugar specific proteins*. Science 177: 949-959.
4. Rudiger, H. (1984): *On the physiological role of plant lectins*. BioScience 34: 95-99.
5. Aub, J.C., Tieslau, C., Lankester, A. (1963): *Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolisaccharides*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 50: 613-619.
6. Inbar, M., Sachs, L. (1969): *Interaction of the carbohydratebinding protein Concanavalin A with normal and transformed cells*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 63: 1418-1425.
7. Stockert, R.J., Marrell, A.G., Scheinberg, I.H. (1974): *Mammalian hepatic lectin*. Science 186: 365-366.
8. Ofek, I., Mirelman, D., Sharon, N. (1977): *Adherence of Escherichia coli to human mucosal cells mediated by mannose receptors*. Nature 265: 623-625.
9. Schwartz, A.L. (1984): *The hepatic asialoglycoprotein receptor*. CRC Crit. Rev. Biochem. 16: 207-233.
10. Gabius, H.J. (1988): *Mammalian lectins: their structure and their glycobiological and glycoclinical roles*. Research Reviews. Biochemistry. 1: 210-214.
11. Barondes, S.H. (1988): *Bifunctional properties of lectines: lectins redefined*. Trends in Biochem. Sci. 13: 480-482.

## DETERMINACION DE UNA ACTIVIDAD ENZIMATICA ELECCION DE METODOS ALTERNATIVOS Y NECESIDAD DE CONTROLES

Antonio Liras, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, España.

## RESUMEN

La medida de una actividad enzimática y el estudio de su regulación, constituyen los objetivos básicos de la Enzimología.

En este trabajo se profundiza en el tema de la medida de una actividad enzimática, en concreto, la fosforribosilpirofosfato amidotransferasa, enzima clave de la biosíntesis *de novo* de nucleótidos purínicos, desde el punto de vista de la elección óptima del método alternativo para la determinación de la actividad enzimática, en función del tipo

de reacción que cataliza la enzima y la diferente utilización de los sustratos para rendir distintos productos, así como de la necesidad de los controles adecuados en el ensayo para evitar falsas y equívocas determinaciones.

## INTRODUCCION

La Enzimología como importante parcela de la Bioquímica, tiene como objetivos principales el estudio de las moléculas enzimáticas mediante la

medida de su actividad catalítica y el estudio de sus propiedades moleculares, estructurales y reguladoras.

En concreto, la medida de una actividad enzimática se fundamenta en la elección del método analítico más adecuado, en función de la reacción catalizada por la enzima, en la diferente utilización y especificidad por los sustratos para rendir diferentes productos y en función de la necesidad de establecer controles adecuados del ensayo para evitar los resultados falsos y equívocos.

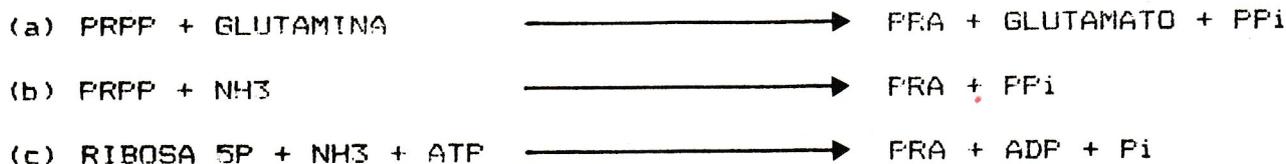
Para determinar una actividad enzimática es necesario tener en cuenta varios aspectos relativos a esa enzima: a) la actuación global de la reacción catalizada; b) un procedimiento analítico para la determinación del sustrato que desaparece o del producto de la reacción; c) la necesidad de cofactores como iones metálicos o coenzimas; d) la dependencia de la actividad respecto a la concentración de sustrato ( $K_m$ ) y e) las condiciones óptimas para la actividad como son pH, temperatura o fuerza iónica.

Los métodos para la determinación de una actividad enzimática, generalmente están diseñados para medir la velocidad de formación de productos, o desaparición de sustratos, aprovechando las diferentes propiedades, sobre todo colorimétricas y espectrofotométricas del sustrato y del producto, ya sea de forma continua (métodos cinéticos) midiendo la aparición de producto o desaparición de sustrato durante el transcurso de la reacción o bien a tiempo fijo, tras la detención de la reacción, mediante los métodos de muestreo. Entre estos últimos destacan los radiométricos o radioquímicos,

en que una vez detenida la reacción se mide el producto (cuentas o desintegraciones por minuto) formado a partir de un sustrato marcado radiactivamente.

En este trabajo se ilustra la importancia que la elección de un método analítico, lo más específico y sensible posible, representa en la valoración de una enzima, así como la utilización de los controles necesarios en el ensayo, mediante un estudio sencillo de la enzima fosforribosilpirofosfato amidotransferasa (PRPP-AT), actividad clave en el control del metabolismo de nucleótidos purínicos, y en concreto, de un crustáceo, *Artemia salina*, donde se ha puesto a punto su valoración en nuestro laboratorio. *Artemia* es un crustáceo anostráceo, adaptado a condiciones ambientales de elevada salinidad, que constituye un modelo muy adecuado para estudios de diferenciación y desarrollo, que es fácilmente manejable y cultivable en un laboratorio a partir de su estadio de gástrula enquistada o quiste, y que es suministrado comercialmente.

El primer intermediario específico que se produce en la ruta de biosíntesis *de novo* de nucleótidos purínicos es la fosforribosilamina (PRA). Este metabolito se puede sintetizar en extractos celulares a partir de tres reacciones: a) A partir de fosforribosilpirofosfato (PRPP) y glutamina, catalizada por la enzima fosforribosilpirofosfato amidotransferasa y reacción considerada como la más importante (1); b) A partir de PRPP y amonio, catalizada por la enzima fosforribosilpirofosfato aminotransferasa, posiblemente una subunidad de la anterior (2), y c) A partir de ribosa-5-fosfato y amonio, reacción que no se ha demostrado que funcione en células intactas (3).



En suma, para la medida de la actividad enzimática que cataliza alguna de estas reacciones, es preciso utilizar el método más adecuado de tal forma que, como en este caso, sea útil para el estudio simultáneo de los tres tipos posibles de reacción, en función del correspondiente tejido y la diferente utilización de sustratos.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los quistes de *Artemia* se obtuvieron de San Francisco Bay Brand Co. ( $^{35}\text{S}$ ) cistina (210 mCi/mmol) de Radiochemical Center (Amersham). Fosforribosilpirofosfato (PRPP), ribosa 5P y L-glutamina eran de Sigma Chemical Co. El resto de los reactivos fueron de grado analítico obtenidos de Merck o Carlo Erba.

Los quistes de *Artemia* se trataron y las nauplias se crecieron sincrónicamente en medio salino por el procedimiento descrito por Liras (4) excepto para la concentración salina del medio de crecimiento Dutrieu (5) que se utilizó diluido cinco veces. Las nauplias de *Artemia* se desarrollaron por 48 horas, y después de la eclosión de los quistes, se utilizaron para el estudio enzimático tras un proceso de purificación de la actividad PRPP-AT que implicó una precipitación ácida para desactivar la actividad de glutaminasas, una precipitación con sulfato amónico al 55% y una cromatografía en Sephadex G-25 (6). Para la determinación de la actividad enzimática de PRPP-AT se eligió un método en que se medía la formación de fosforribosilamina, cualesquiera que fueran los sustratos: PRPP o ribosa 5P, o glutamina o amonio como donadores de nitrógeno y que ha sido descrito anteriormente en otros sistemas por King y Holmes (7). Este método se basa en la determinación de un aducto estable formado entre

la PRA y la ( $^{35}\text{S}$ ) cisteína preparada a partir de ( $^{35}\text{S}$ ) cistina. La mezcla de reacción estándar contenía PRPP 5mM o ribosa 5P 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, glutamina 5mM o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  100 mM, mercaptoetanol 10 mM, DTT 0.86 mM y ( $^{35}\text{S}$ ) cisteína 53 mM, en Tris-HCl 100 mM, pH 8.6. La cisteína y el complejo PRA-cisteína se separaron por electroforesis de alto voltaje y se determinó la actividad en función de la radiactividad medida en este complejo, que es directamente proporcional a la concentración de PRA formada en la reacción enzimática catalizada por la PRPP-AT.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para establecer los controles precisos para la determinación de las actividades enzimáticas PRPP-AT tipo I, II y III mediante la medida del complejo ( $^{35}\text{S}$ )cisteína-PRA formado, se estudió la capacidad de los sustratos PRPP y ribosa 5P para formar complejo con la cisteína. En la figura 1 se muestra

la formación del complejo ( $^{35}\text{S}$ )cisteína-PRPP y ( $^{35}\text{S}$ )cisteína-ribosa 5P en ausencia de preparación enzimática, expresada como incremento del porcentaje de complejo formado respecto a la basal en ausencia de PRPP o ribosa 5P. El rango de concentraciones estudiado para estos dos sustratos fue el comprendido entre 0 y 25 mM. Se observa que en presencia de PRPP en el rango de concentración estudiado, el incremento en la formación del complejo no es significativo, mientras que en presencia de ribosa 5P a una concentración de 4 mM, la formación de complejo ya se puede considerar significativa y representar, a concentraciones superiores a 15 mM, un incremento del 90% con respecto al encontrado con PRPP.

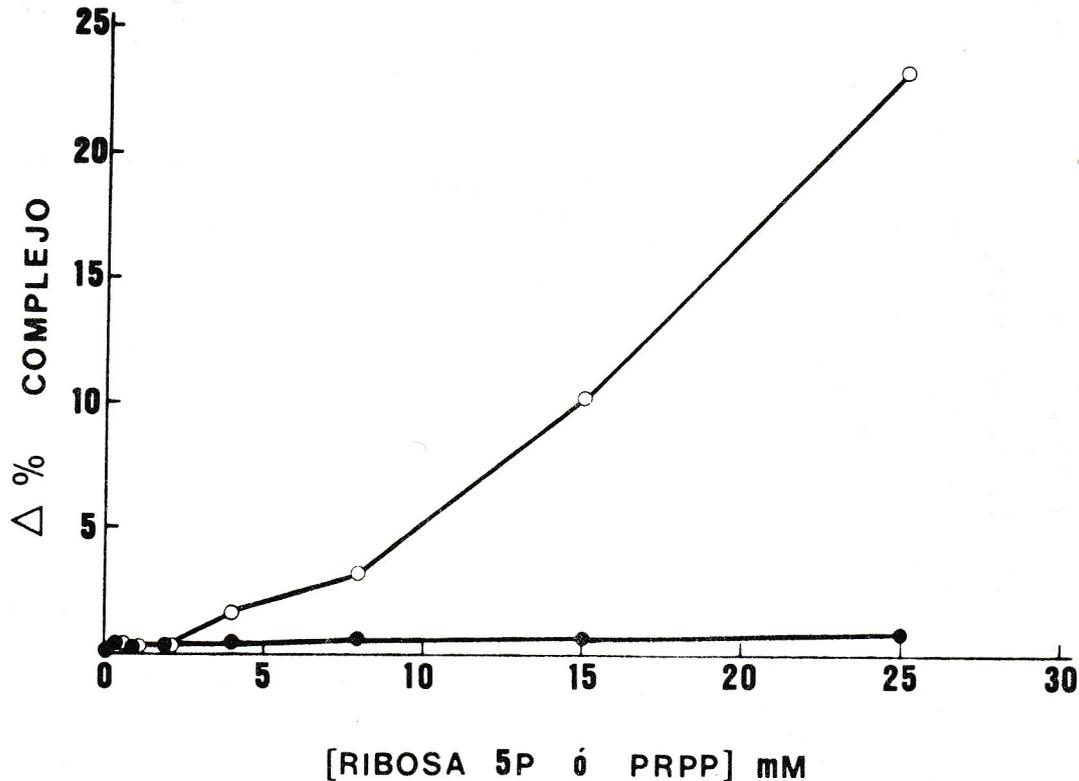


Figura 1. Formación del complejo marcado ( $^{35}\text{S}$ ) cisteína-ribose 5P (o) y ( $^{35}\text{S}$ ) cisteína-PRPP (●) en el rango de concentración 0 a 25 mM de ribosa 5P o PRPP, en ausencia de preparación enzimática. Los datos se expresan como incrementos del porcentaje de formación del complejo respecto a la basal en ausencia de ribosa 5P o PRPP.

En la figura 2 se muestra la actividad de PRPP-AT en función de la concentración de sustrato PRPP o ribosa 5P, el tipo de donador de nitrógeno glutamina o amonio y que corresponden a los tres tipos de enzima PRPP-AT I, II y III. La actividad expresada como porcentaje de complejo ( $^{35}\text{S}$ )cisteína-PRA, varía considerablemente de un tipo a otro de enzima,

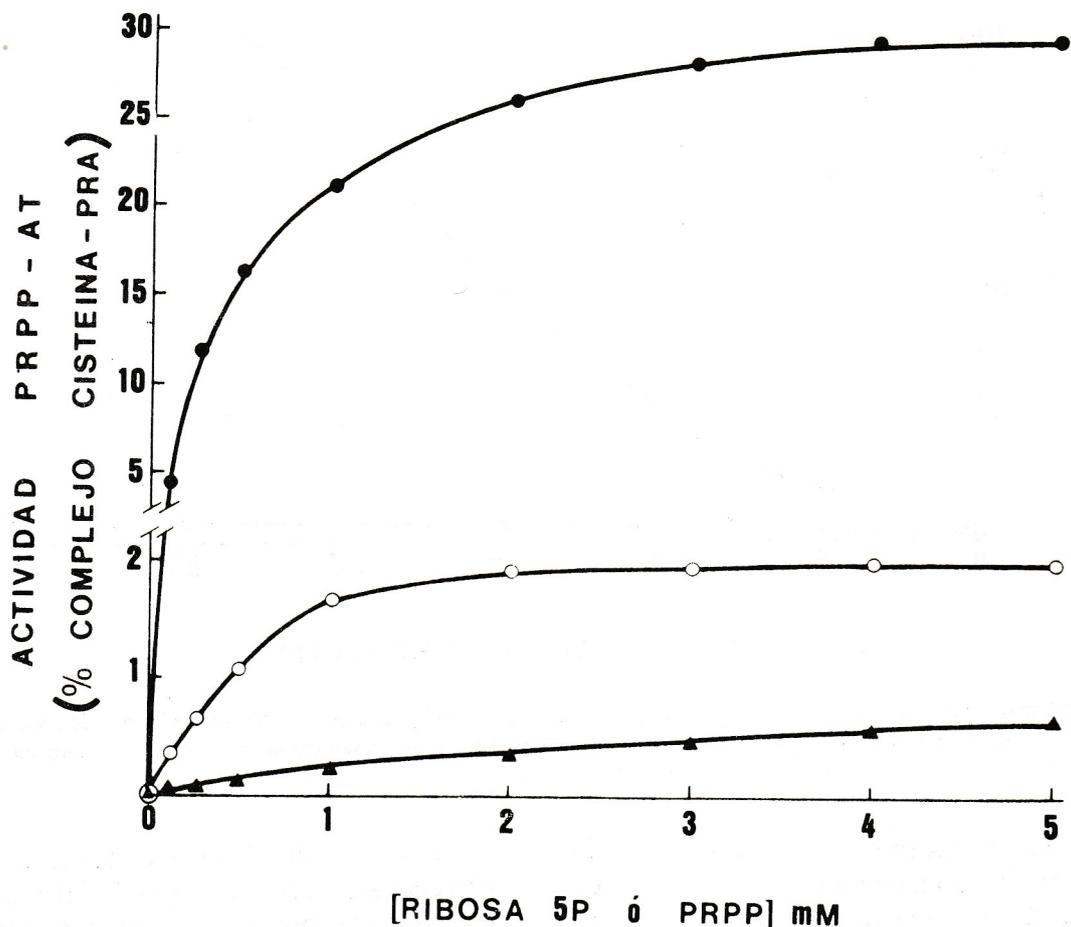
correspondiendo a la de tipo I la mayor  $V_{\text{máx}}$ , 14 y 47 veces superior a la de tipo II y III respectivamente, calculadas por dobles recíprocos (Tabla I). Los valores de  $K_m$  para la enzima tipo I y II son similares aproximadamente de 0.6 mM, mientras que, para la enzima de tipo III es significativamente mayor, 2.5 mM (Tabla I).

TABLA I

| Tipo enzima | Sustrato  | Dador de N | $K_m$ (mM) | $V_{\text{máx}}$   | $V_{\text{máx I}}/V_{\text{máx}}$ | $\times^a$ |
|-------------|-----------|------------|------------|--------------------|-----------------------------------|------------|
| I           | PRPP      | GLUTAMINA  | 0,65       | 30,00 <sup>b</sup> | -                                 |            |
| II          | PRPP      | AMONIO     | 0,50       | 2,20               | 14                                |            |
| III         | RIBOSA 5P | AMONIO     | 2,50       | 0,64               | 47                                |            |

<sup>a</sup> X representa el tipo II y III en cada caso.

<sup>b</sup> Actividad enzimática expresada en porcentaje de complejo cisteína-PRA formado.



**Figura 2.** Actividad PRPP-AT tipo I, II y III en función de la concentración de sustrato PRPP, glutamina (●); PRPP, NH<sub>3</sub> (○); y ribosa 5P, NH<sub>3</sub> (▲) respectivamente. La actividad se expresa como porcentaje de complejo (<sup>35</sup>S) cisteína-PRA formado.

El método elegido como alternativo para la valoración de la enzima PRPP-AT en *Artemia salina*, en función de las tres posibles reacciones catalizadas por esta enzima y que rinde como producto común la fosforribosilamina (PRA), primer intermediario específico de la ruta biosintética *de novo* de purinas y que se basa en la formación de un complejo cisteína-PRA directamente proporcional a la cantidad de PRA formada en la reacción enzimática, nos permite, en nuestro caso, el estudio de cada tipo de

reacción en función de la utilización de diferentes sustratos PRPP o ribosa 5P y diferentes donadores de nitrógeno glutamina o amonio.

Se eliminan también así las interferencias debidas a la presencia de glutaminasas, que se presentan en la valoración de esta enzima por el método de medida de glutamato marcado formado a partir de (<sup>14</sup>C) glutamina, método puesto a punto en *Artemia* en nuestro laboratorio y que sólo nos ofrecía infor-

mación acerca de la primera reacción catalizada por la PRPP-AT.

De esta forma, en nuestro sistema biológico se detectan dos formas isoenzimáticas, posiblemente independientes: PRPP-AT I y II, en función de los valores similares de  $K_m$ , siendo mayoritaria la forma de tipo I en función de su mayor valor de  $V_{máx}$ . El tipo III podría ser otra entidad enzimática minoritaria en este sistema y con una muy baja afinidad por ribosa 5P en presencia de amonio como donador de nitrógeno.

En cualquier caso y en general, se ha de elegir un método analítico enzimático que reúna en sí mismo confiabilidad, sensibilidad y reproducibilidad, teniendo en cuenta sus limitaciones experimentales en función del modelo biológico o sistema tisular en que se estudia la actividad enzimática y su distinta composición isoenzimática.

Es por esta razón, que el desarrollo de controles en ausencia de sustrato o de extracto enzimático se hacen absolutamente necesarios. En nuestro caso, el estudio de la reacción que utiliza ribosa 5P no parece ser muy preciso, ya que la formación del complejo cisteína-PRA en ausencia de extracto enzimático, se observa ya a una concentración de ribosa 5P de 4 mM, mientras que el control con PRPP indica que éste no forma complejo con cisteína por debajo de una concentración de 25 mM. Este método, por tanto, sería válido tan sólo en este caso, para valores de  $K_m$  bajos (menores de 1 mM) de la enzima PRPP-AT tipo III.

Se podría pues concluir diciendo que, la elección del método analítico para el estudio de una actividad enzimática y sus posibles isoenzimas, así como el establecimiento de los controles adecuados, constituyen los dos pilares fundamentales en todo estudio enzimológico.

## REFERENCIAS

1. Wyngaarden, J.B. (1972): *Glutamine phosphoribosyl-rophosphate amidotransferase*. En Cellular Regulation. Editores: Horecker, B. y Stadtman, E. Academic Press. Nueva York. pp. 135-176.
2. Reem, G.H. (1974): *Enzymatic synthesis of phosphoribosylamine in human cells*. J. Biol. Chem. 249, 1696-1703.
3. Reem, G.H. (1968): *Enzymatic synthesis of 5'-phosphoribosylamine from ribose 5-phosphate and ammonia, an alternate first step in purine biosynthesis*. J. Biol. Chem. 243, 5965-5971.
4. Liras, A. (1988): *Regulación de la vía de síntesis de novo de purinas en larvas de Artemia, e influencia de factores experimentales*. Tesis Doctoral. Ed. Univ. Complutense. Madrid. España. pp. 64-67.
5. Dutrieu, J. (1960): *Observations biochimiques et physiologiques sur le developement d'Artemia saline Leach*. Arch. Zool. Exp. Gen. 99, 1-133.
6. Llorente, P., Carratalá, M., Liras, A. y Rotllán, P. (1987): *De novo purine biosynthesis in developing Artemia nauplii. En Artemia Research and its Applications*. Editores: Declair, W., Moens, L. Slegers, H., Jaspers, E. y Sorgeloos, P. Universa Press. Bélgica. pp. 243-252.
7. King, G.L. y Homes, E.W. (1976): *A new assay for the determination of phosphoribosylamine*. Anal. Biochem. 75, 30-39.

## OTRAS COMUNICACIONES

### DEL BUEN DECIR... (3)

#### MASA MOLECULAR, MASA MOLECULAR RELATIVA Y PESO MOLECULAR

Como existe cierta confusión en el uso de estos términos, que no son intercambiables, hacemos las siguientes aclaraciones:

*DALTON (Da)*. Es la unidad de masa atómica. Equivale a 1/12 de la masa del núcleo  $^{12}\text{C}$  y es igual a  $1.6605655 \times 10^{-27}$  kg.

*MASA MOLECULAR*. Es la masa de una molécula calculada en daltones. Debe expresarse así: la masa molecular de la proteína x es 26 kDa.

*MASA MOLECULAR RELATIVA ( $M_r$ )*. Es la masa de una molécula en relación con el Dalton. Debe expresarse así: se aisló una proteína de  $M_r$  26,000. Nótese que, como se trata de una dimensión relativa, no tiene unidad.

*PESO MOLECULAR (PM)*. Debe dejar de usarse pues es una dimensión incorrecta. En caso de usarse, debe expresarse así: se aisló una proteína de peso molecular 26,000. En la actualidad se prefiere sustituirlo por las expresiones anteriores.

COMISIÓN DE DEFENSA DEL  
LENGUAJE BIOQUÍMICO,  
SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA

# 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 aquellas 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 mechanism 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.

- 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 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 de longitud 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., o bien a través del corresponsal del BEB en su localidad.