

BEB 93

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

VOL. 12

No. 1

MARZO 1993

EDITORIAL

EN ESTE MES SE CUMPLEN 11 AÑOS...

Como el título lo expresa, en este Marzo de 1993, se cumplen once años de que se publicó por primera vez el Boletín de Educación Bioquímica, el *BEB*. En aquella ocasión el *Editorial* lo escribió Enrique Piña Garza y para título utilizó una frase del inmortal Don Miguel de Cervantes Saavedra, que en la primera línea del prólogo de su *Quijote* dice: "*Desocupado lector, sin juramento...*"

Después de once años de esfuerzos, queremos ahora dirigirnos nuevamente a los desocupados lectores, a los cuales deseamos darles algún otro tipo de ocupación, dentro de las diversas tareas que se requieren de llevar a cabo, para hacer que el *BEB* pueda seguirse publicando.

Sin duda una de las tareas que puede parecer de las más fáciles es la de lector, sin embargo, el que desarrolla esta tarea, adquiere casi sin darse cuenta una gran responsabilidad con los que hacen posible que el material que ha leído llegue hasta él. Esa responsabilidad consiste en dar a conocer a los que producen esas lecturas, sus opiniones, dicho de otra manera tiene la responsabilidad de *retroalimentar* el sistema, de tal forma que lo ayude a evolucionar.

Es en este sentido que ahora solicitamos la activa

participación de los lectores, de los que esperamos que en unas cuantas líneas o en todo un tratado, nos hagan llegar sus opiniones, es decir las respuestas a los estímulos que significan los materiales que ponemos a su disposición, las que seguramente nos permitirán mejorar nuestra, de *ustedes* y de *nosotros*, publicación.

En una sociedad de consumo y desperdicio como en la que vivimos, mucho de lo que se fabrica y se vende, se impone a los consumidores y es raro que éstos tengan la posibilidad de hacer llegar sus opiniones sobre la calidad de los productos a los que se dedican a comercializarlos. En nuestro caso en particular, *necesitamos* de esas opiniones para comprobar que la producción del Boletín no ha sido un desperdicio y que de cierta manera llena o ayuda a satisfacer algunas de las necesidades de información de nuestros lectores.

A propósito de la última frase del párrafo anterior *...de nuestros lectores...* en el número correspondiente a Junio de 1985 (Volumen IV, número 2, página 61), se les extendió una invitación para que se comunicaran con nosotros y expresaran, a través de esa sección, sus opiniones sobre los artículos que se publican en esta revista. La respuesta fue punto menos que inexistente ya que en los casi ocho años

COMITE EDITORIAL

ALFONSO CARABEZ TREJO
Facultad de Medicina
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 Subirán"

CARLOS LARRALDE RANGEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas

JAIME MAS OLIVA
Facultad de Medicina e Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

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

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

EDITOR EN JEFE

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



Facultad de Medicina
UNAM

INDICE

BEB 93 Vol. 12 Num. 1 Marzo 1993

EDITORIAL

EN ESTE MES SE CUMPLEN 11 AÑOS...
El Comité Editorial.....1

ARTICULOS

LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA, PCR: UN IMPACTO RECIENTE EN LA BIOLOGIA MOLECULAR.
Raúl Arredondo-Peter.....3

NIVELES DE COMPLEJIDAD Y COMUNICACION.
Jesús Manuel León Cázares y María Teresa Elizabeth Flores Rodríguez.....15

CALCIO; DE SIMPLE MINERAL A MODULADOR ESENCIAL DE SEÑALES CELULARES.
Jaime Mas Oliva.....22

OTRAS COMUNICACIONES

REUNION ACADEMICA DE FUNDACION DE LA ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA, A.C.
Yolanda Saldaña de Delgadillo.....27

AVISOS

I CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO.....29

XX TALLER DE ACTUALIZACION BIOQUIMICA...29

V CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA.....29

II CONGRESO DE LA ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA, A.C.....30

VI REUNION NACIONAL DE BIOQUIMICA VEGETAL.....30

VIII CONGRESO DE BIOENERGETICA Y BIOMEMBRANAS.....31

A LOS CORRESPONSALES DE PROVINCIA.....31

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA.....32

EN ESTE MES...

transcurridos a partir de dicha invitación, sólo se ha recibido una carta dirigida a esa sección. Si fuéramos menos optimistas diríamos que esto se debe a que el Boletín no se lee y que sí no se lee es por que realmente no tiene interés para las personas que lo reciben. Sin embargo y precisamente debido a la falta de comunicación con los suscriptores, que no se han manifestado en el sentido de que la publicación no les sirva, tenemos la necesidad de pensar en que existen otras razones que no han permitido que se establezca un buen sistema de comunicación, como alguno de los que se ejemplifican en uno de los artículos que integran este número, y que por lo tanto todavía podemos aspirar a tener sus opiniones y sus colaboraciones directas y decididas para continuar con este esfuerzo, que aquí *si con juramento*, nos pueden creer que quisiéramos que esta publicación, como hija del

entendimiento, fuera no la más hermosa, sino la más útil.

Entonces, mucho nos gustaría que nos hicieran el favor de iniciar esa comunicación, que los corresponsales de la provincia, correspondieran, como dice su nombramiento honorífico (acerca de lo que se incluye también en este número una nueva invitación) y que el resto de los lectores, nos informaran de lo que les parece bien o de lo que quisieran que hiciéramos para que realmente lleguen a considerarse como parte del equipo de trabajo, que de una u otra manera, ha permitido a esta revista el llegar a cumplir cuando menos en el tiempo, lo que quisiéramos satisfacer en cuanto a las necesidades de ustedes, los lectores, que son sin lugar a dudas la razón principal por la que Don Miguel de Cervantes Saavedra escribió el Quijote y por la que cada uno de los autores de los artículos, notas y editoriales del *BEB*, lo han hecho... ¡por ustedes!

El Comité Editorial

LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA, PCR: UN IMPACTO RECIENTE EN LA BIOLOGIA MOLECULAR

Raúl Arredondo-Peter. Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado postal 70-242, 04510 México, D.F.:

RESUMEN

Durante las últimas dos décadas han surgido una serie de procedimientos de laboratorio que facilitan en mucho el análisis del ADN; de entre ellos, la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, probablemente es el que ha tenido el mayor impacto en el avance reciente de la biología molecular. Esta técnica permite amplificar, a gran escala, regiones específicas del ADN, y facilita la manipulación posterior de los fragmentos amplificados. El principio del PCR se basa en el uso de oligonucleótidos sintéticos que son complementarios a secuencias que flanquean una región específica del ADN molde. Así, por medio de ciclos de amplificación repetidos, que comprenden cambios de temperatura que permiten el alineamiento de los oligonucleótidos

con las secuencias complementarias y la síntesis del fragmento de interés, mediante el uso de una ADN polimerasa, es posible obtener regiones discretas del ADN. Las características del PCR se han modificado de acuerdo con las necesidades específicas del campo de estudio en el que se aplica. En esta revisión se discuten tanto los principios básicos, como los componentes de la reacción, y algunas de las aplicaciones del PCR.

PALABRAS CLAVE. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR, amplificación, ADN, ARN.

I. GENERALIDADES.

El ácido desoxirribonucleico, o ADN, es una

biomolécula que contiene la información necesaria que determina la estructura y la función de las células. Dicha información se codifica en la secuencia de sus cuatro bases nitrogenadas: las purinas adenina (A) y guanina (G), y las pirimidinas timina (T) y citosina (C) (Figura 1a). El desarrollo de una serie de técnicas ha permitido, en los últimos años, conocer con detalle la secuencia de bases de regiones discretas del ADN, o genes, que codifican para la síntesis de proteínas específicas, así como de algunas otras regiones que no son codificantes pero que regulan la expresión de dichos genes a lo largo del proceso de la diferenciación de las células.

Posteriormente al descubrimiento de las enzimas de restricción, durante la década de 1970, que son endonucleasas que cortan al ADN en sitios específicos, surgieron una serie de técnicas que permiten en la actualidad detectar genes o regiones específicas del ADN mediante el uso de sondas moleculares, las cuales corresponden a fragmentos de ADN de tamaño molecular pequeño (unas 20 a 2,000 pares de bases, pb) que son complementarias a las secuencias de interés. El ADN es una molécula que se forma por dos cadenas que son complementarias entre sí, ya que las bases púricas se aparean con las pirimidicas mediante la formación de puentes de hidrógeno (Figura 1b). Debido a esta característica, se utiliza la sonda molecular, que se marca previamente al incorporar nucleótidos radioactivos, para aparearla, o hibridarla, con la secuencia complementaria en el ADN genómico que se digiere previamente con las enzimas de restricción y que se separa mediante electroforesis en gel. La región de interés se localiza entonces al revelar una placa

fotográfica que se expone a la emisión radioactiva de la sonda marcada.

Estos procedimientos, que en la generalidad se conocen como hibridaciones ADN-ADN del tipo "Southern", debido al nombre del investigador que las desarrolló, han permitido obtener genes que se introducen, o clonan, en vectores que pueden ser plásmidos o fagos, para propagarlos, secuenciarlos o, en suma, manipularlos de acuerdo con los intereses del investigador. Sin embargo, y aún cuando estas técnicas se describen con sencillez su manejo cotidiano en el laboratorio implica una serie de inconvenientes, como son: a) su desarrollo, desde la purificación y digestión del ADN con las enzimas de restricción adecuadas, hasta la detección de las señales de hibridación, requiere de periodos de tiempo largos; b) es necesario controlar de manera óptima las condiciones en las que se lleva a cabo la hibridación, es decir, la astringencia, para evitar la presencia de hibridaciones inespecíficas, o falsos positivos; c) una vez que se detecta la señal de hibridación, resulta complicado recuperar la banda de interés de entre cientos de bandas que se obtienen cuando se digiere un ADN complejo; y d) ya que se recuperó el fragmento de interés, y que se clonó en el vector adecuado, dicho fragmento puede contener solamente una porción del gen al inicio o al final, o también pudiera ser un fragmento muy grande, de unos 20,000 pb (20 Kpb), en el cual será necesario localizar el gen de interés después de secuenciar todo el fragmento, o su mayor parte.

Estos procedimientos se han simplificado en gran medida durante los últimos años gracias al desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, o

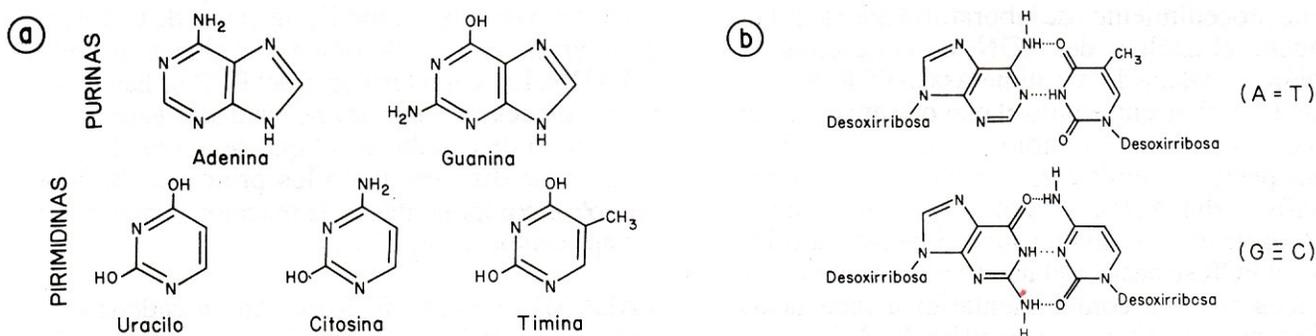


Figura 1. a) Estructura química de las purinas y las primidinas. b) Apareamiento de las bases púricas y las pirimidicas, y formación de puentes de hidrógeno.

PCR (del inglés "Polymerase Chain Reaction"), lo cual ocurrió en 1985 (1). Este procedimiento permite amplificar de manera casi exponencial fragmentos definidos a partir de un ADN genómico complejo. El impacto que ha tenido esta técnica en los estudios genéticos se aprecia con el hecho de que tan sólo en 1989 se publicaron más de 800 artículos de investigación en los cuales se hace referencia a esta técnica, y alrededor de 2,000 durante 1992. A continuación se presenta una revisión breve que pretende introducir al lector a los principios y las aplicaciones del PCR, sobre los cuales recientemente se han publicado varios trabajos que condensan de manera adecuada la información más relevante a este respecto (2,3,4).

II. LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

EL PRINCIPIO DEL PCR. La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, es una técnica que permite amplificar secuencias específicas de ADN o ARN, de tal manera que es posible detectar copias únicas de genes, las cuales se pueden manipular posteriormente. El procedimiento consiste en realizar ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN molde, el alineamiento de dos oligonucleótidos con las secuencias complementarias al ADN de interés, y la extensión mediante la actividad de una ADN polimerasa (Figura 2a). Ambos oligonucleótidos se alinean en los extremos del fragmento del ADN molde que se desea amplificar, de tal manera que después de la síntesis de la cadena complementaria se desnaturaliza con calor el dúplex resultante para repetir unas 30 veces este ciclo, lo que da lugar a una

amplificación exponencial de 2^{30} veces aproximadamente (Figura 2b). Como una característica importante, el ADN molde puede estar en forma pura o formar parte de una mezcla de biomoléculas, y además puede presentar cierta degradación; esto ha permitido amplificar fragmentos a partir de muestras de tejidos, de pelo humano, de sangre deshidratada, de tejido cerebral momificado, e inclusive a partir de un mamut congelado que data de unos 40,000 años de antigüedad (5).

LOS CICLOS DE TEMPERATURA. Cuando la secuencia de interés que se requiere amplificar se localiza en un ADN genómico, las dos cadenas están apareadas en forma de dúplex. Este ADN se desnaturaliza al calentarlo a 94°C aproximadamente durante 1 minuto, lo que resulta en la separación de las dos hebras. Posteriormente, y al enfriar y mantener a la solución entre 40 y 60°C , durante 1 minuto, los dos oligonucleótidos se alinean con las secuencias complementarias del ADN molde, lo que permite que se inicie la síntesis de la cadena complementaria por la ADN polimerasa cuando se eleva la temperatura de la solución a 72°C , y se mantiene así durante otro minuto. Al conjunto de estas etapas se le conoce como un ciclo de amplificación (Figura 2c). Generalmente el primer ciclo de amplificación es precedido por una etapa de desnaturalización, lo que ocurre cuando la solución se mantiene de 94 a 95°C durante 3 a 5 minutos, con el objeto de desnaturalizar por completo el ADN molde; al final de los ciclos de amplificación la solución se mantiene a 72°C durante unos 5 minutos para permitir que los fragmentos que se amplificaron se encuentren como cadenas dobles.

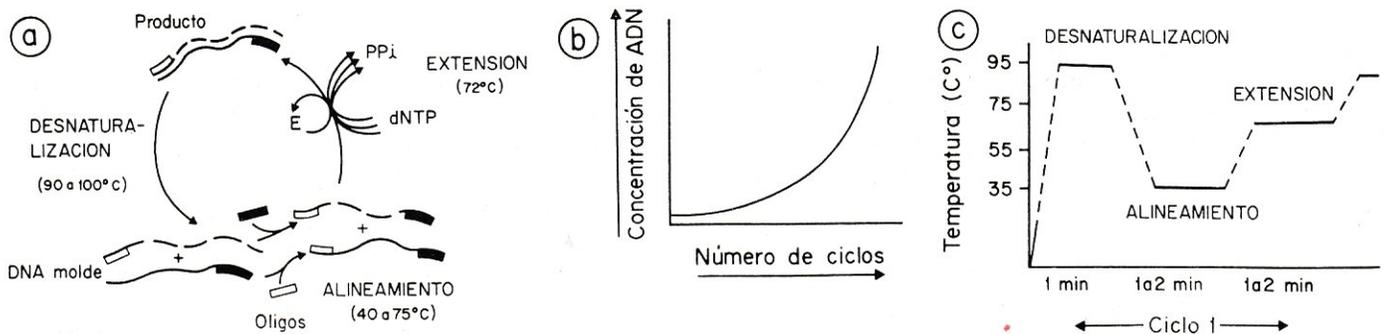


Figura 2. a) Reacción en cadena de la polimerasa y sus componentes; E, enzima ADN polimerasa; dNTP, desoxirribonucleótido de trifosfato, PPi, pirofosfato. b) Amplificación de fragmentos de ADN por PCR. c) Temperaturas estándar durante un ciclo de amplificación. Tomado de 3.

Posteriormente, se corre una alícuota de la solución de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio para detectar la banda de interés bajo la irradiación con luz ultravioleta.

La etapa crítica en estos procedimientos es la desnaturalización, ya que depende de ella el que se abran las cadenas y que los oligonucleótidos se alinien con las secuencias complementarias. Además, la temperatura del alineamiento determinará la especificidad del PCR, ya que cuando la temperatura es muy baja el apareamiento puede ser inespecífico, lo que resulta en la amplificación de regiones equivocadas; pero en cambio, cuando la temperatura del alineamiento es muy alta, los oligos pueden no aparearse con las regiones complementarias, lo que resulta en una amplificación nula.

En sus inicios, los ciclos de temperatura del PCR se realizaban manualmente mediante el uso de baños de agua o de aceite a las tres diferentes temperaturas. Sin embargo, en la actualidad se cuenta con una gran diversidad de aparatos que llevan a cabo los ciclos de temperatura de manera automática y con gran precisión.

LOS COMPONENTES DE LA REACCION. a) La Enzima ADN Polimerasa. La ADN Polimerasa I de *Escherichia coli* lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria del ADN molde en el sentido 5' a 3' siempre y cuando exista un grupo -OH libre en la posición 3' de un fragmento de ADN que se conoce como cebador ("primer"), a partir de donde se inicia la síntesis. Además de la actividad de polimerasa, esta enzima muestra actividad de exonucleasa en el sentido 5' a 3', y puede corregir errores durante la síntesis en el sentido 3' a 5'.

Estas dos últimas actividades se localizan en un dominio de la proteína, mientras que la actividad de polimerasa se localiza en otro dominio. Fue Klenow quien logró separar ambos dominios mediante hidrólisis enzimática controlada y purificar el péptido de la ADN polimerasa I que muestra la actividad de polimerasa, pero no la de exonucleasa; a dicho péptido se le conoce como el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I.

En los inicios del PCR, se utilizó al fragmento Klenow para llevar a cabo la amplificación de la secuencia de interés, sin embargo, el procedimiento resultaba muy costoso debido a que la actividad de

la enzima se pierde rápidamente por las altas temperaturas a las que se somete la solución, por lo que era necesario añadir más enzima cada cierto número de ciclos de amplificación. Sin embargo, la purificación de una ADN polimerasa termoestable, a partir de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, fue una aportación de mucha importancia para el desarrollo de la técnica; actualmente se conoce a esta enzima como la Taq ADN polimerasa. Esta enzima tiene un peso molecular cercano a los 93.910 kDa con una actividad específica de 200,000 U/mg, cuya temperatura óptima, en donde se observa su actividad máxima, es entre los 75 y 80°C; su tasa de incorporación de nucleótidos, Kcat, es de unos 150 nucleótidos/s/enzima. Como característica importante, la Taq ADN polimerasa conserva el 50% de su actividad después de 130, 40 y 6 minutos a 92.5, 95 y 97.5°C, respectivamente (revisado en 2).

b) El Amortiguador. La solución amortiguadora estándar para el PCR contiene KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.4, MgCl₂ 1.5 mM y gelatina en concentración de 100 µg/ml. De entre estos componentes, la concentración del ión Mg⁺⁺ es de mucha importancia, ya que depende de ella la eficiencia y la especificidad de la amplificación, en cuanto al alineamiento de los oligonucleótidos con el ADN molde y la actividad de la polimerasa; generalmente se obtienen buenos resultados cuando esta concentración varía en el intervalo de los 1.5 a los 4 mM, sin embargo, es importante mantener baja la concentración de EDTA, ácido etilendiamino tetraacético, que es un quelante de iones mono y divalentes, y el cual es un componente común en los amortiguadores en los que se disuelve el ADN, el que puede modificar la concentración final del Mg⁺⁺ libre en el amortiguador de amplificación.

c) El ADN Molde. Como ya se mencionó, las preparaciones del ADN molde se pueden obtener de extractos semicrudos y no es necesario purificar exhaustivamente este ADN. Cuando se trabaja con ADN genómico, cuyo tamaño molecular y complejidad son elevados, normalmente se aplican entre 0.5 y 1.0 µg de ADN a la solución de amplificación, pero en ocasiones el fragmento de interés ya está clonado en algún vector, por ejemplo en un plásmido, y en este caso disminuye la cantidad de ADN a amplificar, en donde se pueden utilizar tan sólo unos cuantos nanogramos.

d) Los Oligonucleótidos Sintéticos. Para que la

amplificación se lleve a cabo, es necesario seleccionar dos oligonucleótidos sintéticos, u oligos, que hibriden con regiones del ADN molde que se localicen en los extremos de la región de interés. Estos oligos se deben orientar con sus extremos 3'(-OH) hacia el oligo opuesto, es decir, deben estar encontrados, y ser complementarios para ambas cadenas del ADN molde (Figura 2a). La longitud de los oligos es de 15 a 30 nucleótidos, y su secuencia debe presentar la mayor similitud posible con la secuencia blanco, ya que de ello depende el éxito y la especificidad de la amplificación; se recomienda que la complementariedad entre el oligo y la secuencia blanco sea cercana al 100%, en las últimas 5 a 6 bases del extremo 3' del oligo, para asegurar la amplificación. Además, se debe evitar que ambos oligos muestren secuencias complementarias entre sí, particularmente en sus extremos 3', para evitar la formación de dímeros o de concatenámeros; así mismo, también es necesario evitar la presencia en los oligos de secuencias que favorezcan la formación de estructuras secundarias que pueden interferir en el alineamiento correcto. Típicamente, el contenido de G+C debe ser alrededor de 40 a 60% para ambos oligos.

Generalmente se recomienda determinar el valor T_m , o temperatura de fusión de los oligos, ya que este valor resulta necesario para calcular la temperatura teórica en la que se debe llevar a cabo el alineamiento, o T_a , mediante la siguiente ecuación: $T_a = T_m - 5^\circ\text{C} = 2(A+T) + 4(G+C) - 5^\circ\text{C}$. Este valor T_a normalmente oscila entre los 60 y 65°C, sin embargo, dadas las características del sistema de amplificación, T_a puede variar significativamente hasta alcanzar valores extremos, tal es el caso de la experiencia del autor, en donde para algunos sistemas T_a varía entre los 37 y 42°C. Por lo tanto, bajo condiciones normales, la temperatura del alineamiento determina la especificidad de la amplificación, en donde a mayor temperatura, es decir, en condiciones astringentes, la especificidad será mayor, y a la inversa. Generalmente los oligos se añaden a la solución de amplificación en una concentración que oscila entre los 0.1 y 1.0 μM .

e) Los Desoxirribonucleótidos de Trifosfato, dNTPs. Al llevar a cabo la reacción de síntesis de una cadena complementaria, la ADN polimerasa incorpora desoxirribonucleótidos al formar un enlace

fosfodiéster entre el grupo -OH libre en el extremo 3' de la cadena naciente y el grupo fosfato 5' del dNTP; la energía para tal reacción proviene de la hidrólisis del fosfato γ de cada dNTP que se incorpora. En el caso del PCR, cada dNTP se agrega a la solución en una concentración que oscila alrededor de los 200 μM , sin embargo, es muy importante mantener la concentración equimolar entre los cuatro dNTPs, lo que evita que la Taq ADN polimerasa incorpore algún dNTP equivocado en determinadas posiciones, lo que incrementaría la tasa de error de la polimerasa por nucleótido que se polimeriza, la cual se calcula como 1.5×10^{-5} y 0.7×10^{-5} para sustituciones o cambios del marco de lectura, respectivamente (6). Por otro lado, se sabe que cuando la concentración de los dNTPs excede los 50 mM, se inhibe la actividad de la Taq ADN polimerasa.

III. APLICACIONES DEL PCR.

CLONACION. Después de detectar una región del ADN que resulta de particular interés, la siguiente etapa es el análisis de dicha región, ya sea mediante la secuenciación para conocer la información que contiene, o mediante el análisis funcional al realizar, por ejemplo, fusiones génicas con otras secuencias cuya expresión da lugar a la síntesis de enzimas cuya actividad se puede seguir colorimétricamente.

Estas manipulaciones genéticas se facilitan enormemente si el fragmento de interés se clona en algún vector. En este sentido, el PCR favorece la clonación si se incorporan regiones de restricción en los extremos 5', cuando se sintetizan los oligos, de tal manera que es posible clonar los fragmentos que se amplifiquen al aprovechar estos sitios de restricción en el vector (Figura 3a). Recientemente se reportó que la enzima Taq ADN polimerasa agrega una adenina adicional al terminar con la polimerización, de tal manera que el fragmento que se amplificó, en forma dúplex, contiene una adenina no apareada en cada extremo 3', a lo que se conoce como un extremo pegajoso; esta característica es útil ya que al digerir el plásmido pTA12 con la enzima de restricción XcmI, ésta corta en un sitio único lo que deja una timina libre en cada extremo 3', y que permite entonces ligar al fragmento amplificado mediante el uso de la enzima ligasa del fago T4 (Figura 3b) (7).

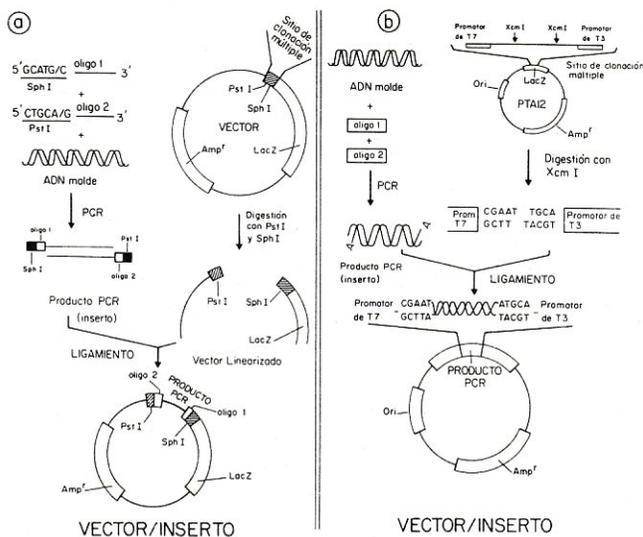


Figura 3. Clonación de fragmentos, que se amplificaron por PCR, en plásmidos que contienen sitios de clonación múltiple. a) Los fragmentos contienen extremos 5' para las enzimas de restricción PstI y SphI, lo que permite clonar en el vector cuando éste se digiere con las dos enzimas. b) La enzima Taq ADN polimerasa agrega una adenina, A, adicional en los extremos 3' del fragmento, lo que permite clonar en el plásmido pTA12 cuando éste se digiere con la enzima XcmI, ya que resultan extremos pegajosos con una timina, T, libre. Amp^r, gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina; LacZ, gen que codifica para la síntesis de la enzima β galactosidasa, cuya actividad se detecta al degradar al galactósido y generar un color azul, de manera alternativa, cuando se clona algún inserto en esta región se interrumpe la expresión de LacZ, y por lo tanto las colonias son blancas; Ori, sitio del origen de la duplicación del plásmido.

CUANTIFICACION DEL NUMERO DE COPIAS DE GENES O DE ARNm. En el pasado se determinaba el número de copias de algún gen específico, o su expresión, por medio de procedimientos de hibridación por "Southern blot" o por "Dot blot", en donde la sonda marcada se hibrida con una cantidad conocida del ADN de interés, y la estimación del número de copias del gen se calcula al determinar la intensidad de la señal de hibridación por densitometría. Sin embargo, por medio de este procedimiento es posible calcular tan solo de manera aproximada el número de copias del gen o su nivel de expresión, además se requieren cantidades relativamente grandes de ADN o ARN por cada

ensayo, y finalmente el desarrollo de estos procedimientos es laborioso y consume demasiado tiempo.

En los últimos años se han desarrollado procedimientos que se basan en el PCR para poder determinar el nivel de expresión de algún gen por medio de la cuantificación del ARNm (revisado en 8). Estos procedimientos requieren de la síntesis de un ADN complementario, ADNc, a partir del ARN muestra por medio de la enzima transcriptasa reversa. Este ADNc se usa como molde para amplificar las secuencias de interés al utilizar los oligos adecuados. Posteriormente se corre el producto de la amplificación en una electroforesis, se tiñe el gel con bromuro de etidio y se fotografía; de manera alternativa, se hibrida el fragmento que se amplificó con una sonda marcada que corresponde con alguna región interna de dicho fragmento. De esta manera, cuando la amplificación se lleva a cabo al incluir algún control, cuya concentración se conozca con anterioridad, es posible determinar el nivel de expresión de algún gen. Este procedimiento ha sufrido múltiples modificaciones, como lo es el incluir en la amplificación un ADN molde que compita con el fragmento de interés, de tal manera que al adicionarlo en cantidades diferentes a las mezclas de PCR que contengan la misma cantidad del ADN de interés, el nivel de amplificación de este último se calcula al comparar la intensidad de los dos productos que se amplificaron; por lo tanto, la amplificación se lleva a cabo al utilizar el mismo par de oligos, pero los productos de la amplificación se distinguen en el gel por su tamaño. Esta estrategia se utilizó con éxito para cuantificar el número de genes que codifican para la enzima dihidrofolato reductasa, DHFR, cuyo número aumenta en las células tumorales como resultado de la presencia del metotrexato, que es un análogo del folato que se une a la DHFR, lo que inhibe su actividad y la síntesis del timidilato y de las purinas. El procedimiento consistió en sintetizar un par de oligos que permitieran la amplificación del exón 4 del gen *dhfr*, lo que resultaría en un segmento de 183 pb. La coamplificación se realizó al utilizar el mismo par de oligos que hibridarían con sus secuencias complementarias, las que flanqueaban un fragmento determinado de 275 pb que se había clonado previamente en un plásmido (Fig. 4a), de tal manera que la coamplificación resultaría en la generación del fragmento de 183 pb, que corresponde al exón 4 del gen *dhfr*, y de otro fragmento con 315 pb de longitud (275 pb + 20 pb de cada oligo), que corresponde al fragmento competitivo. Así, al ana-

lizar el trazo densitométrico de la fotografía del gel (Fig. 4b), el número de moléculas de la muestra inicial se determina para aquella coamplificación en donde la proporción del gen competitivo con el molde sea igual a 1 (8).

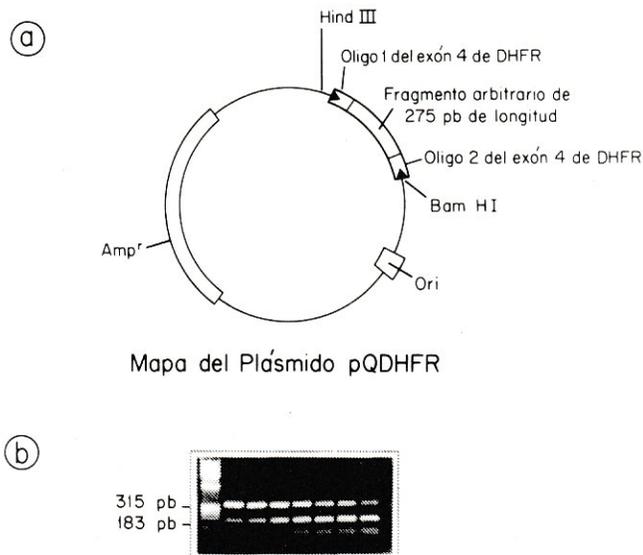


Figura 4. a) Mapa del plásmido pQDHFR que contiene las regiones para el uso de los oligos DHFR que permiten amplificar por PCR un fragmento de 275 pb, de secuencia arbitraria, y una región de 183 pb del gen que codifica para la DHFR. b) Gel que muestra las bandas que se amplifican cuando el plásmido pQDHFR se agrega en cantidades decrecientes y conocidas a la solución de amplificación. Tomado de 8.

ANÁLISIS EN CLÍNICA. Al realizar una búsqueda rutinaria de bibliografía en los bancos de información, es evidente que tal vez entre un 70 y 80% de las aplicaciones del PCR se enfocan hacia la detección de agentes patógenos, particularmente virus y bacterias. Esto se debe a que se conocen regiones del genoma de estos agentes que están evolutivamente conservadas y, por lo tanto, son características de cada uno de ellos, de tal manera que el uso de los oligos adecuados puede permitir la detección del agente de interés al amplificar fragmentos específicos por PCR. Estos procedimientos tienen la gran ventaja de la versatilidad y la sensibilidad, además de la rapidez, cuando se comparan con los procedimientos tradicionales que implican reacciones metabólicas, tinciones, tipificación en medios de cultivo, serología, o hasta procedimientos histológicos.

Uno de los campos principales de aplicación del PCR en la detección de agentes patógenos es en el desarrollo de métodos rápidos y sensibles para detectar el virus HIV-1, que causa el SIDA. En muestras de pacientes el virus HIV-1 se detecta mediante serología, al utilizar la prueba de ELISA, o por hibridaciones del tipo "Western"; en ambos casos las muestras se hacen reaccionar con anticuerpos que están dirigidos hacia las proteínas de la cápside del virus. Sin embargo, gracias a que en la actualidad se conoce la secuencia completa del genoma del HIV-1, se utilizan pares de oligos para amplificar fragmentos conservados de las regiones *env* y *gag* de este virus, las cuales codifican para la síntesis de las proteínas que forman las envolturas, a partir de linfocitos humanos; mediante este procedimiento es posible amplificar fragmentos de 142 y 115 pb de longitud, respectivamente (9), a partir inclusive de estados tempranos de la infección o cuando se encuentra en estado latente, en donde la serología es incapaz de detectar a los componentes virales.

Otro campo de aplicación del PCR es en la detección del papilomavirus del humano, HPV, el cual se asocia con ciertos tipos de cáncer cérvico-uterino. Varios investigadores japoneses utilizan con éxito pruebas diagnósticas para este virus mediante la amplificación por PCR, al usar oligos que hibridan con la región L1 de su genoma, la cual está conservada entre diferentes tipos de virus HPV, y que resulta en el aumento en la sensibilidad durante la detección cuando este método se compara con otros que se utilizaban con anterioridad, por ejemplo, la hibridación del tipo "Southern", en donde no se obtienen señales en algunas muestras, pero sí en los fragmentos de amplificación cuando se realiza el PCR (10).

Recientemente, estas aplicaciones clínicas del PCR se han favorecido en gran medida con el desarrollo de procedimientos que permiten llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de interés, inclusive, a partir de muestras que se han procesado histológicamente y que se conservan como laminillas para observación (11). Esto resulta de mucha utilidad para el análisis retrospectivo, o para confirmar la ausencia de agentes patógenos en las muestras originales.

MICROBIOLOGIA AMBIENTAL. Dada la sensibilidad y la especificidad que se alcanza al diseñar

adecuadamente los experimentos del tipo PCR, esta técnica resulta útil al analizar el contenido microbiológico del agua y del suelo (revisado en 12), de donde es posible obtener cantidades suficientes de ADN por medio de procedimientos como la centrifugación en gradientes de CsCl, la cromatografía en columnas de hidroxilapatita, precipitación con etanol, etc. Por ejemplo, se ha utilizado la amplificación de los genes *lacZ* y *uid*, que codifican para la β galactosidasa y la β glucuronidasa, respectivamente, para detectar a *Escherichia coli* y a otros patógenos entéricos como contaminantes fecales del agua. Así mismo, mediante la amplificación de un fragmento de unos 1,000 pb se alcanza una sensibilidad mayor en la detección de la bacteria del suelo que degrada herbicidas, *Pseudomonas cepacia*, esto en comparación con el procedimiento anterior que se llevaba a cabo por medio de la hibridación del tipo "dot-blot".

VARIABILIDAD GENETICA. Una característica intrínseca de las poblaciones es la variabilidad, gracias a la cual las especies cambian a través del tiempo, es decir, evolucionan, y aún cuando en apariencia ellas resultan más o menos homogéneas, cuando se analizan algunos de sus componentes emerge un nivel de variabilidad enorme. En sus principios, dicha variabilidad se detectó por medio de los perfiles electroforéticos de enzimas particulares, o zimogramas; posteriormente, se utilizaron sondas moleculares específicas que, después de marcarlas por medios radioactivos o no radioactivos, se hibridaban con el ADN digerido que se había separado previamente en un gel por electroforesis y que se había transferido a un filtro de nitrocelulosa o de nylon, en donde se lleva a cabo la hibridación, de tal manera que el número de bandas de hibridación indica el número de copias del gen, o región específica, a partir de la cual se diseñó la sonda. Actualmente, el PCR contribuye al conocimiento de la variabilidad de grupos de organismos, ya que al diseñar los oligos adecuados, ésta será evidente al analizar el resultado de la amplificación, sobre todo debido a que es posible detectar diferencias en tan sólo una posición en donde haya ocurrido una sustitución o una delección de bases, al correr los productos de la amplificación en electroforesis desnaturizante, en presencia de urea (13); ello se debe a que dichas alteraciones en la secuencia de los fragmentos inducen la formación de estructuras secundarias diferentes, lo que se detecta como la

migración característica de cada fragmento en el gel.

Actualmente, es una práctica común el diseñar oligos pequeños, de unos 5 nucleótidos de longitud, cuya secuencia sea al azar, lo que permite obtener el patrón de bandas del ADN de intrínsecos (14); sin embargo, dada la sensibilidad, se recomienda en este caso el uso de un gel de poliacrilamida que contenga urea y teñir con nitrato de plata, debido a que la electroforesis en un gel de agarosa que se tiñe posteriormente con bromuro de etidio presenta una sensibilidad menor. Este método tiene la ventaja de que no es necesario conocer la secuencia del ADN molde para poder llevar a cabo la amplificación, además de que no es necesario marcar a los oligos para detectar las bandas; pero en cambio, tiene la desventaja de que los fragmentos que resulten de interés, sean conservados o variables, se mantendrán como "bandas sin identidad" ya que se desconoce su secuencia, y por lo tanto, su función dentro del genoma.

EVOLUCION MOLECULAR. Una de las aplicaciones más impresionantes del PCR es precisamente en el campo de la evolución molecular, tanto por sus alcances como por la importancia de la información que se puede obtener de ella. Por lo general, cuando se realizan estudios de evolución, éstos comparan características morfológicas o moleculares de organismos actuales, a partir de donde se establecen inferencias de descendencia; esto es así porque el registro fósil, aunque informativo, es incompleto debido a fenómenos geológicos, lo que nos impide leer en él de manera íntegra la historia de la vida en la tierra. En este sentido, ha resultado de mucho interés la amplificación de fragmentos de ADN por medio del PCR a partir de muestras de tejido de restos fósiles, como lo es el mamut siberiano (en 5), cuya fosilización fue por congelación, o a partir de tejido momificado, como el de algunas momias egipcias en donde se logró amplificar algunos fragmentos de secuencias del ADN mitocondrial (15). Un reporte aún más sorprendente, es la amplificación de un fragmento de ADN a partir de hojas fósiles de las plantas *Magnolia* y *Cocculus* que datan de hace unos 12×10^6 años, en el Mioceno; el resultado de dicha amplificación es un fragmento de 770 pb (Fig. 5) que codifica para la enzima ribulosa 1,5 -difosfato carboxilasa, *rbl*, ya que se utilizaron oligos que hibridan con regiones conservadas de este gen (16). El fragmento que se

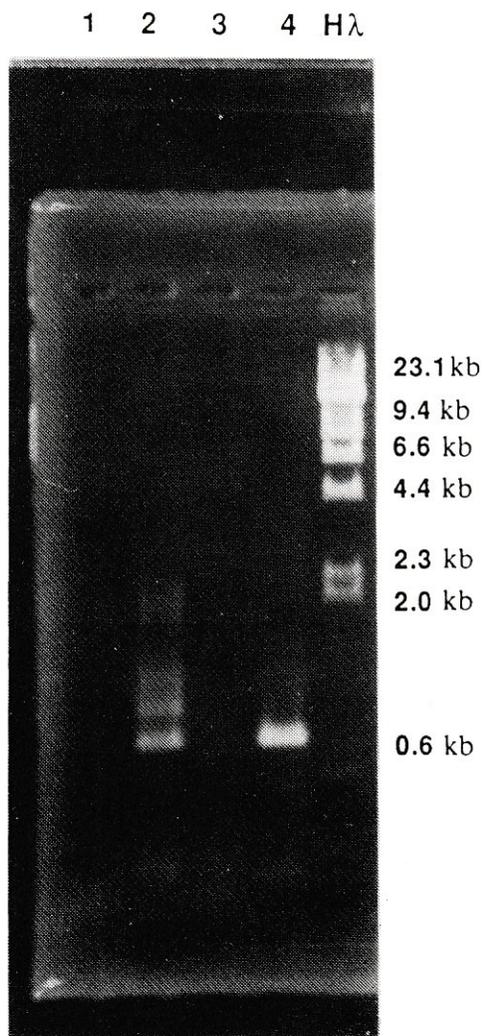


Figura 5. Amplificación por PCR de fragmentos del gen *rbcL* a partir de ADN fósil. Se utilizaron los oligos LtrbcL 1 y LtrbcL1201R que permiten amplificar una región del gen que codifica para la enzima ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa. 1, control negativo; 2, control positivo con ADN contemporáneo de *Hordeum spontaneum*; 3, amplificación a partir del ADN fósil de *Cocculus*; 4, amplificación a partir del ADN fósil de *Cocculus* que se trató previamente con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y la ligasa del fago T4 para reparar las regiones dañadas de este ADN; H lamda, marcadores del tamaño molecular. Tomado de 16.

amplificó se hibridó con una sonda molecular que corresponde al gen *rbcL* actual para confirmar su identidad, y después de clonarlo y secuenciarlo fue posible determinar que el producto de la amplificación es un fragmento del gen *rbcL* el cual muestra algunas diferencias en la secuencia cuando se le compara con el gen contemporáneo. Por supuesto, dada la alta sensibilidad de la técnica del PCR, su aplicación en estudios como éstos solamente es posible bajo condiciones controladas para evitar la contaminación con ADN contemporáneo y al utilizar los controles adecuados.

DETECCION DE GENES NUEVOS. La técnica de PCR también resulta útil para obtener genes cuya existencia se desconocía en determinados organismos; la estrategia contempla dos enfoques principales. En primer lugar, cuando se conoce la estructura primaria de una cadena peptídica de interés, es posible conocer la secuencia del gen que la codifica al realizar la traducción inversa, sin embargo, dado que el código genético está degenerado, existe la posibilidad de que diferentes bases ocupen el mismo lugar, particularmente en la tercera posición del codón, luego, al sintetizar el oligo en el aparato apropiado se incorporan las distintas bases cuando es necesario, de tal manera que el oligo resultante muestra un cierto nivel de "degeneración" en determinadas posiciones (Fig.6a), lo que da una oportunidad mayor de que hibride con la secuencia complementaria para permitir la amplificación (17). La segunda estrategia, que es la que comúnmente se lleva a cabo en el laboratorio donde trabaja el autor, y que ha permitido aislar fragmentos que pudieran codificar para la síntesis de hemoglobinas en plantas en donde se desconocía su existencia, consiste en alinear las secuencias del gen de interés que se reportan en la literatura para construir una secuencia consenso en la cual se detectarán las regiones conservadas (Figura 6b) (18). Estas regiones se utilizan para la síntesis de los oligos que permitirán la amplificación o, alternativamente, para sintetizar sondas moleculares que se hibridan con los fragmentos que se amplificaron para autenticar su identidad.

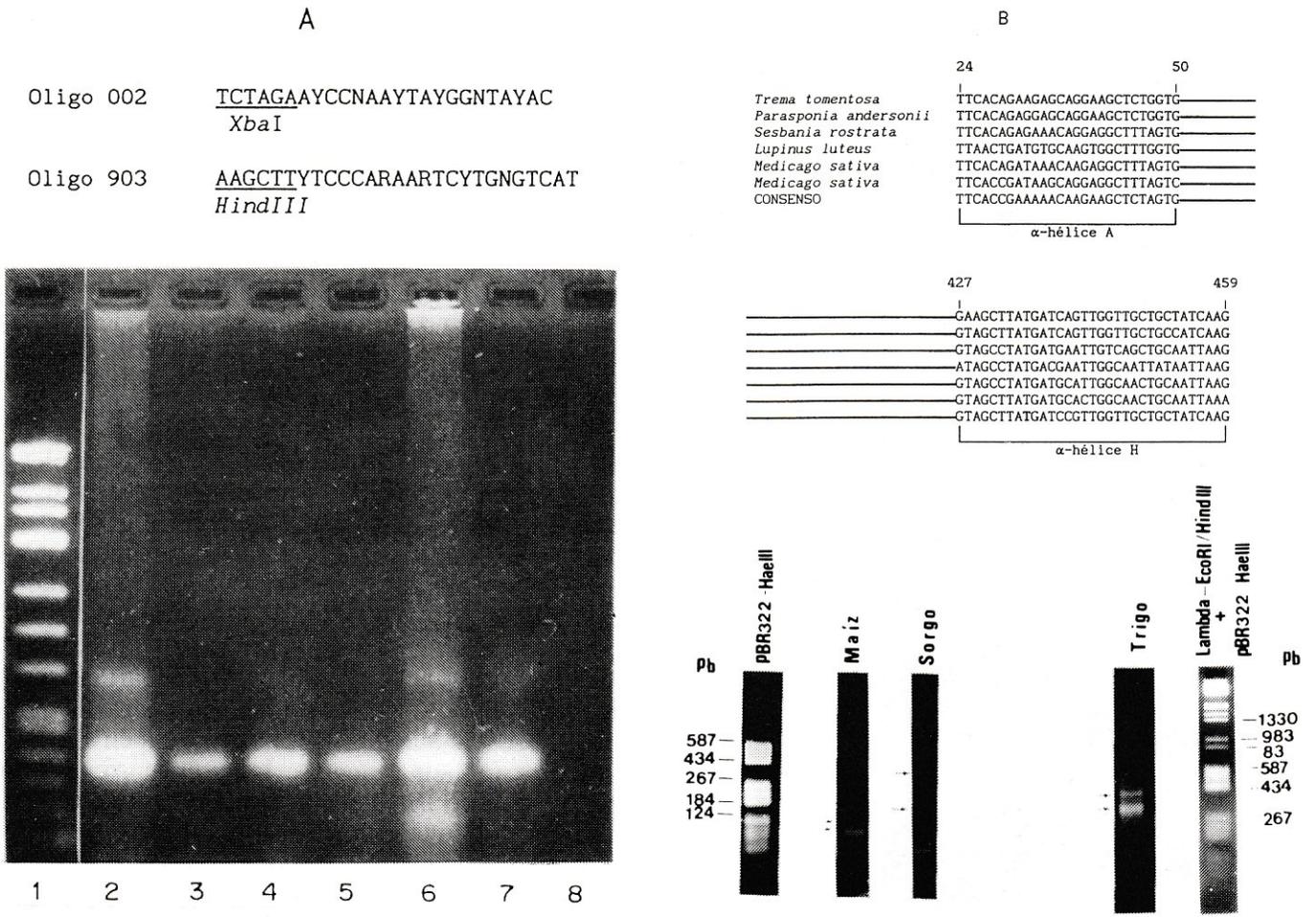


Figura 6. A) Uso de los oligos degenerados 002 y 903 y amplificación en insectos por PCR de fragmentos del gen *para* que codifica un polipéptido que forma un canal de sodio en *Drosophila*; 1, marcador de tamaños moleculares; 2, *Aedes aegypti*; 3, *Trichoplusia ni*; 4, *Heliothis virescens*; 5, *Leptinotarsa decemlineata*; 6, *Periplaneta americana*; 7, *Tetranychus urticae*; 8, control negativo; R, purina, Y, pirimidina, N, G, A, T o C. Tomado de 17. B) Alineamiento de los genes *hb* que codifican para hemoglobinas de plantas, y secuencias consenso (18) que se utilizan como oligos para amplificar fragmentos por PCR, a partir del ADN de plantas monocotiledóneas; las flechas indican los productos de la amplificación, Kb. kilopares de bases; pb, pares de bases.

ASPECTOS LEGALES. La técnica de PCR es una herramienta útil cuya aplicación aporta evidencias adicionales en aspectos de tipo legal. El principio de esta aplicación se basa en la variabilidad genética que existe entre los individuos, de la cual se habló en párrafos anteriores, además de la gran sensibilidad del método, ya que por medio de ella se

amplifican fragmentos a partir de cantidades pequeñas de ADN que se obtienen de restos de tejido epitelial, sangre seca, semen, o cabello.

Los leucocitos de humanos contienen el antígeno DQ alfa cuyo locus se ubica en el cromosoma 6 que presenta seis alelos que determinan la existencia de

21 genotipos. Mediante el uso de los oligos adecuados se amplifica un fragmento de unos 240 pb de longitud del locus DQ alfa el que se hibrida por medio de "dot-blot" en un filtro de nitrocelulosa que contiene a los fragmentos DQ alfa de cada uno de los seis alelos. Así, al determinar por hibridación el alelo DQ alfa al que pertenece la víctima, el sospechoso o la evidencia, se obtiene información que indica si el sospechoso fue o no el poseedor del ADN bajo análisis (Figura 7). Debido a que este procedimiento se ha comercializado, su práctica en criminalística es común en diversos países, entre ellos México.

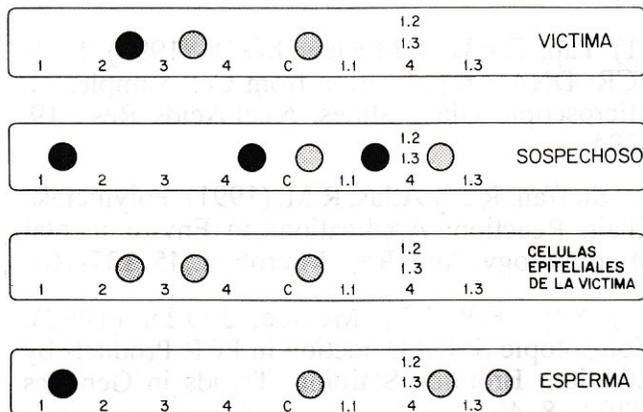


Figura 7. Ensayo para determinar si existe alguna relación entre un individuo sospechoso y las muestras de ADN que se obtuvieron en el lugar del crimen, a partir de donde se amplificó por PCR al utilizar oligos que flanquean a la región DQ alfa; los filtros de nitrocelulosa contienen fragmentos de ADN de los seis alelos posibles de DQ alfa. El patrón de manchas indica que no existe relación entre el ADN del individuo sospechoso y las muestras de esperma. Tomado de 19.

IV. CONCLUSIONES.

En la actualidad el ser humano cuenta con herramientas experimentales poderosas que han permitido generar un cúmulo de conocimientos durante las últimas décadas. A ocho años de su desarrollo y con base en el número de citas en las que se hace referencia al PCR, esta técnica ha catalizado de manera importante el estudio y la facilidad para manipular el material genético; así, hoy en día tenemos acceso al análisis de fragmentos genéticos, lo que hace algunos años resultaba sumamente complicado debido, principalmente, a dificultades

de índole experimental. Además, el PCR ha abierto las puertas para llevar el estudio básico del ADN a los aspectos aplicados que redundan en mejorar la calidad de vida del género humano, así como contribuir al entendimiento cabal del mundo orgánico que nos rodea. Seguramente será dentro de unos cuantos años más cuando conoceremos el impacto que habrá tenido esta técnica en la generación de conocimientos, lo cual le dará su lugar real en el panorama de la ciencia.

Sin embargo, aún cuando lo expuesto en las secciones anteriores resulta estimulante, no es la intención del autor mostrar a esta técnica como una panacea, ya que como la mayor parte de los procedimientos del laboratorio, el PCR presenta una serie de inconvenientes. Uno de los problemas principales de esta técnica resulta de la característica que la hace una herramienta poderosa que permite la obtención de fragmentos específicos del ADN, es decir, la capacidad de amplificar a partir de cantidades extraordinariamente pequeñas de muestra, por lo que la contaminación con otro ADN exógeno es un riesgo constante que puede llevar a la generación de falsos positivos. En este sentido, se han desarrollado diversos procedimientos que permiten evitar la contaminación, tanto del material como de los reactivos, que van desde la separación del espacio físico en donde se preparan las diferentes muestras y se llevan a cabo las amplificaciones, o el uso de material desechable, hasta el desarrollo de procedimientos químicos que permiten destruir el ADN contaminante. Entre estos últimos destaca el uso del nucleótido dUTP durante la amplificación, en sustitución del dTTP, de tal manera que los fragmentos que resulten de dicha amplificación contendrán dUTP; así, el adicionar la enzima uracilo N-glucosilasa, UNG, que degrada al dUTP, a la mezcla de amplificación previamente al desarrollo del PCR, permitirá destruir cualquier fragmento contaminante que provenga de la amplificación anterior en donde se incorporó el dUTP. Posteriormente, la enzima UNG se inactiva al incubar la solución en altas temperaturas, lo que permite iniciar con el proceso de amplificación después de añadir nuevamente el dUTP (en 19).

Sin embargo, y además del uso de estos procedimientos para evitar la contaminación, siempre es necesario incluir la amplificación de un control negativo, que generalmente carece del ADN molde, el que mostrará la existencia de amplificaciones inespecíficas en el caso de que haya contaminación.

Con toda seguridad el PCR evolucionará aún más dentro de los próximos años, y los problemas que se presenten se resolverán tarde o temprano; así, seremos testigos del cúmulo de información que se generará como resultado de la aplicación de este procedimiento, además de la información con la que contamos hoy en día. Pero lo que resulta aún más excitante es pensar en la nueva generación de técnicas, y sus posibilidades, que seguramente tendremos en el futuro, y de la cual el PCR pudiera ser tan sólo el inicio.

AGRADECIMIENTOS. El autor desea agradecer el trabajo secretarial de la Sra. Victoria Godínez, y el trabajo de dibujo y fotografía del Sr. Arturo Franco.

V. REFERENCIAS

- 1) Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of β Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, 230, 1350.
- 2) Bej, A.K., Mahbubani, M.H. y Atlas, R.M. (1991). Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and other Methods and their Applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 301-334.
- 3) Bloch, W. (1991). A Biochemical Perspective of the Polymerase Chain Reaction. *Biochemistry*, 30, 2735-2747.
- 4) Erlich, H.A., Gelfand, D. y Sninsky, J.J. (1991). Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252, 1643-1651.
- 5) Mullis, K.B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.*, 262 (4), 36-43.
- 6) Kwiatowski, J., Skarecki, D., Hernández, S., Pham, D., Quijas, F. y Ayala, F.J. (1991). High Fidelity of the Polymerase Chain Reaction. *Mol. Biol. Evol.*, 8, 884-887.
- 7) Mead, D.A., Pey, N.K., Hernstadt, C., Marcil, R.A. y Smith, L. M. (1991). A Universal Method for the Direct Cloning of PCR Amplified Nucleic Acids. *Biotechnology*, 9, 657-663.
- 8) Volkenandt, M., Dicker, A.P., Banerjee, D., Fanin, R., Schweitzer, B., Horikoshi, T., Danenberg, K., Danenberg, P. y Bertino, J.R. (1992). Quantitation of Gene Copy Number and mRNA Using the Polymerase Chain Reaction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200, 1-6.
- 9) Gibson, K.M., McLean, K.A. y Clewley, J.P. (1991). A Simple and Rapid Method for Detecting Human Immunodeficiency Virus by PCR. *J. Virol. Meth.*, 32, 277-286.
- 10) Yoshikawa, H., Kawana, T., Kitagawa, K., Mizuno, M., Yoshikura, H. y Iwamoto, A., (1991). Detection and Typing of Multiple Genital Papillomaviruses by DNA Amplification with Consensus Primers. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 524-531.
- 11) Yap, E.P.H. y McGee, J.O.D. (1991). Slide PCR: DNA Amplification from Cell Samples on Microscopic Glass Slides. *Nucl. Acids Res.*, 19, 4294.
- 12) Steffan, R.J. y Atlas, R.M. (1991). Polymerase Chain Reaction: Applications in Environmental Microbiology. *Ann. Rev. Microbiol.*, 45, 137-161.
- 13) Yap, E.P.H. y McGee, J.O.D. (1992). Nonisotopic SSCP Detection in PCR Products by Ethidium Bromide Staining. *Trends in Genetics (TIG)*, 8, 49.
- 14) Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. y Gresshoff, P.M. (1991). DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers. *Biotechnology*, 9, 553-557.
- 15) Foo, I., Salo, W.L. y Aufderheide, A.C.F. (1992). PCR Libraries of Ancient DNA Using a Generalized PCR Method. *BioTechniques*, 12, 811-815.
- 16) Golenberg, E.M. (1991). Amplification and Analysis of Miocene Plant Fossil DNA. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 333, 419-427.
- 17) Doyle, K.E. y Knipple, D.F. (1991). PCR-Based Phylogenetic Walking: Isolation of Para-Homologous Sodium Channel Gene Sequences from Seven Insect Species and An Arachnid. *Insect Biochem.*, 21, 689-696.
- 18) Arredondo-Peter, R. y Escamilla, E. (1991). A Consensus Sequence of Plant Hemoglobins. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9, 195-207.
- 19) Perkin Elmer Cetus (1991). *Biothecnology Catalog*. Norwalk, CT, USA, 75pp.

NIVELES DE COMPLEJIDAD Y COMUNICACION

Jesús Manuel León Cázares. María Teresa Elizabeth Flores Rodríguez. Instituto de Fisiología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. Apartado postal 70 - 381, México 04510, D F.

RESUMEN

A partir de 1948 en que Shannon propuso la Teoría de la Comunicación, dentro del ámbito de la Ingeniería, su campo de influencia ha crecido hasta llegar a los fenómenos biológicos. Dentro de esta área, puede utilizarse para tratar de establecer, a través de la búsqueda de una serie de comunes denominadores, un modelo general que permita encontrar la unidad, dentro de la diversidad característica de los procesos biológicos.

Con este fin se emplea el concepto de Niveles de Complejidad y se selecciona un conjunto de ejemplos, que incluye desde los fenómenos de complementación molecular y los de quimiotaxis más primitiva, hasta los intrincados patrones de comportamiento de los mamíferos superiores y las comunidades animales, en los que se trata de identificar las partes fundamentales que forman el sistema de comunicación de Shannon. El aplicar a los fenómenos biológicos generalizaciones tan amplias como la que se usa en este trabajo, permite organizar y ayuda a comprender mejor el origen y la evolución de algunos procesos biológicos.

Palabras clave: comunicación celular, mediadores y receptores, niveles de complejidad.

INTRODUCCION

Dentro de los niveles de complejidad de la materia, se puede localizar la aparición del fenómeno de la comunicación -entendido como el proceso de intercambio de información que genera un cambio de conducta, entre dos o más elementos que funcionan como recepto-transmisores- en las proteínas y los ácidos nucleicos, en cuyas moléculas quedan registrados los primeros fenómenos químicos de la evolución orgánica.

Lwoff en 1966 (1) propone que en un organismo

todas las moléculas deben trabajar en armonía; cada molécula debe de ser capaz de recibir y transmitir mensajes. En este nivel la información está incluida en secuencias moleculares de bases, púricas y pirimídicas, que determinan a través de sus interacciones, es decir por medio de procesos de comunicación, la estructura de estas moléculas y desde luego sus propiedades características.

En el caso de los ácidos nucleicos, estas interacciones son las responsables de sus capacidades de duplicación, transcripción, traducción y por supuesto de mutación. Todas estas propiedades debidas, en principio, a la posibilidad de complementación entre sus bases.

En las proteínas, una secuencia determinada de aminoácidos -de 150 para el caso de la mioglobina, que tiene un peso molecular de 16,900 y de aproximadamente 70,000 para la enzima piruvato deshidrogenasa, con un peso molecular de 7 millones- propiciará siempre una estructura tridimensional particular, que producirá los sitios activos y de regulación de las enzimas, así como las características de resistencia, flexibilidad y aún transparencia de varias proteínas estructurales, entre las que se encuentra la colágena.

Así, se puede establecer que independientemente unos de otros, estos dos polímeros característicos de los seres vivos, son moléculas que contienen información, que al intercambiarse, produce modificaciones estructurales y capacidades funcionales específicas.

Al considerar estos dos tipos de moléculas ya no por separado, sino como integrantes de un sistema de interacción, es decir de intercambio de información, se establece la relación causa-efecto entre ambos, ya que es necesaria la información contenida en los diversos tipos de polinucleótidos -ADN, ARN mensajero, ARN de transferencia y

ARN ribosomal- para que se lleve a cabo la síntesis de las moléculas proteicas, que a su vez actúan como catalizadores en los procesos de duplicación, transcripción y traducción, que las hicieron posibles, se establece así un buen modelo de lo que se denomina información.

Según Lwoff (1) información “es la secuencia específica de los ácidos nucleicos en el material genético, y es también el sistema de regulación de la actividad enzimática y de la síntesis de proteínas. Lo que puede llamarse información para un ser vivo, es pues una serie de estructuras, de secuencias, un orden bien determinado que representa la información biológica. El concepto de información corresponde a ese conjunto de datos bastante complicados. La palabra información, la palabra mensaje, es algo material; es una secuencia de pequeñas moléculas y el conjunto de las funciones que ellas realizan”.

De esta manera la información fluye y ha fluido en el planeta, desde hace aproximadamente 3,500 millones de años, en que ha mantenido un proceso de reatalimentación -es decir de comunicación- entre los términos del binomio organismo-ambiente, que ha producido los cambios recíprocos que

constituyen la materia prima del proceso de la evolución.

Esta comunicación constituye un estado de verdadera continuidad fisiológica, tan estrecha como la que existe entre el núcleo y el citoplasma de un eucito, según lo describió Carrel en 1931 (2).

Dentro de este binomio, se analizarán varios ejemplos que permitirán identificar los elementos fundamentales de un sistema de comunicación, como el propuesto por Shannon, constituido por un emisor, mensajes, canales y un receptor, en el que se produzca un cambio de comportamiento en las unidades interactuantes, como resultado del intercambio bidireccional de información.

A partir de 1948 en que se publicaron los trabajos de Shannon, Weaver, Winer, Chomsky y otros (3), el fenómeno de la comunicación se ha podido definir en su acepción más simple como: “la reacción característica de un organismo ante un estímulo”, y en un marco de referencia más amplio, como el intercambio de información entre dos o más unidades recepto-transmisoras, que produce una modificación en sus propiedades, es decir en su conducta. Estas unidades están conectadas a través de un canal, cuya eficacia puede ser modificada por la presencia del ruido (Fig 1).

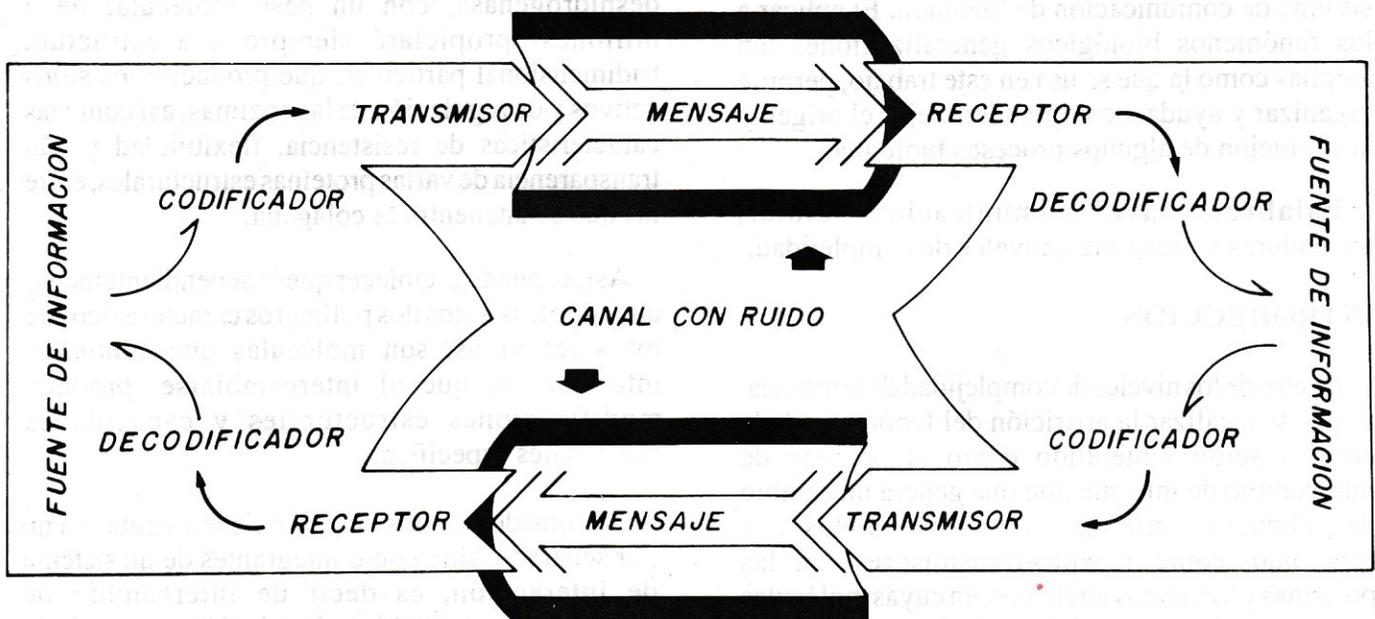


Figura 1. Componentes principales del Sistema de Comunicación de Shannon, representados en dos unidades receptotransmisoras entre las que se establece el proceso de comunicación, a través de un canal. Modificado de Pierce, 1972 (3).

LA QUIMIOTAXIS BACTERIANA

Una reacción característica de un organismo ante un estímulo, es la que se ha estudiado desde hace más de 100 años, mediante la utilización de bacterias flageladas como *Escherichia coli*, que son capaces de manifestar el fenómeno de la quimiotaxis (4).

En estos organismos, las concentraciones, en el medio, de sustancias atrayentes, como aminoácidos y azúcares, o repelentes, como alcoholes y ácidos, determinan su comportamiento al modificar el patrón de desplazamiento basal, es decir el que se produce cuando la bacteria se ha adaptado a las concentraciones constantes en el ambiente, que puede definirse como formado por un 50% de carreras en línea recta, de una longitud semejante, y un 50% de tumbos, es decir de cambios bruscos de dirección al azar, que dan por resultado un diagrama espacio-temporal de forma aproximadamente helicoidal.

Si como resultado del propio metabolismo bacteriano, la concentración de las moléculas "mensaje", aumenta o bien disminuye en el medio, se originan modificaciones en el patrón de desplazamiento basal o adaptado, el cual en el caso del aumento de repelentes o disminución de atrayentes, registrará mayor porcentaje de tumbos y por lo tanto carreras más cortas y menos frecuentes, que alejarán a las bacterias de la zona de mayor concentración de repelentes o de menor concentración de atrayentes.

Si las concentraciones se invierten, aumenta la de los atrayentes y disminuye la de los repelentes, el patrón de desplazamiento basal se modifica, por un incremento en la frecuencia y longitud de las carreras y una disminución en la frecuencia de los tumbos.

En ambos casos se formarán gradientes de concentración de estas sustancias en el medio, como resultado directo de la fisiología bacteriana.

Para que la quimiotaxis se lleve a cabo, es necesario que las bacterias posean moléculas receptoras, cuando menos para los atrayentes, capaces de interactuar con las moléculas "señal" en forma específica, mediante un mecanismo de

complementación estereoquímica, que recuerda el proceso de interacción descrito para los ácidos nucleicos y las proteínas, pues en ambos las uniones débiles, como los puentes de hidrógeno, son parte de las interacciones que se establecen entre las moléculas.

En este caso, los receptores son proteínas que atraviesan todo el grosor de la membrana plasmática, por lo que el reconocimiento se lleva a cabo en la parte superficial externa, pero el efecto se deja sentir en la región citoplásmica de la bacteria, donde se produce el cambio fisiológico correspondiente, por medio de modificaciones en su conformación.

Estos cambios de conformación generan una serie de reacciones, algunas relacionadas con la metilación de ciertas proteínas o con la fosforilación de otras, que incluyen nuevos cambios de conformación, que por último causan que el flagelo cambie su régimen de movimiento o bien se detenga y produzca un tumbo o una carrera.

En este fenómeno de la quimiotaxis bacteriana, se puede identificar, "la reacción característica de un organismo ante un estímulo", en la que intervienen señales ambientales, como los atrayentes, repelentes, temperatura y aún el campo magnético del planeta, además de los receptores específicos capaces de reconocer a esas señales y como consecuencia de ese reconocimiento, experimentar un cambio de conformación, que promueve modificaciones intracitoplásmicas, que por último alteran el patrón de comportamiento basal de carreras y tumbos, que resultará en que la bacteria se mantenga en un medio adecuado que le permita no sólo sobrevivir, sino reproducirse.

En las bacterias quimiotácticas es posible identificar los componentes fundamentales del proceso de comunicación, es decir una parte receptora, una procesadora o internuncial y una efectora, que en conjunto, regulan otros fenómenos como la ósmosis y el metabolismo nitrogenado, que comparten elementos comunes a través de procesos de fosforilación de ciertas proteínas (5).

LA AGREGACION EN MIXOBACTERIAS Y ACRAIALES

En otros ejemplos de comunicación, se puede

analizar el intercambio de información entre unidades receptor-transmisoras, a través de un canal, que produce un cambio de conducta en esas unidades; lo que constituye el fenómeno de agregación y diferenciación, tanto en los protocitos, como es el caso de las mixobacterias del tipo de *Stigmatella aurantiaca* (6), como en algunos protoctistas (7), identificados como acraciales, organismos amiboideos también unicelulares pero eucitos.

En este caso la situación es más compleja, pues una señal que se capta del medio, que por lo general identifica una situación crítica de falta de alimento, desencadena la síntesis y secreción de moléculas mensajeras específicas, que al ser percibidas por otros individuos, modifican su comportamiento y los hacen dirigirse a favor de un gradiente, hasta el sitio de reunión donde se llevará a cabo la agregación y la diferenciación.

En el caso de los Acraciales, a lo largo de este trayecto, cada una de las células que han captado el mensaje en el medio, se transforman en retransmisoras del mismo, con lo que se amplifica de manera importante su alcance, en una verdadera reacción en cadena.

Cuando se ha llevado a cabo la agregación, que puede incluir unos cuantos cientos de miles de bacterias o de amibas, el conglomerado muestra una capacidad de migración hacia sitios iluminados y cálidos; capacidad que no tienen ni las bacterias ni las amibas separadas y que parece ser fundamental, para asegurar una buena dispersión de las esporas. Cuando el conglomerado se detiene se producen otros mensajes y se inicia la sorprendente transformación de una masa informe de células, en una estructura pluricelular organizada columnar con nuevos sistemas de comunicación intercelular, formada principalmente por dos tipos de individuos, los que constituyen el tallo y los que forman uno o varios cuerpos fructíferos, que más tarde contendrán esporas, que resistirán las condiciones críticas del medio y por lo tanto asegurarán la sobrevivencia de la especie.

Si se observan en forma aislada las diversas etapas de este proceso de diferenciación, sería prácticamente imposible de suponer que son

variaciones de un mismo tema, es decir expresiones diferentes de un solo genoma, que se manifiestan de acuerdo con los mensajes particulares que recibe, acerca de las condiciones imperantes en el ambiente.

En este segundo ejemplo es posible también, distinguir la participación de receptores, efectores y mensajeros específicos, es decir de un "lenguaje" que sólo tiene significado para quien lo conoce y puede interpretarlo.

Para algunas especies de Acraciales, el idioma es el del AMP cíclico, para otros el del dipéptido Glorina, lo que hace posible que en el mismo territorio, convivan dos especies y lleven a cabo procesos de comunicación idénticos pero en lenguajes diferentes.

Como consecuencia de la recepción de cada una de las señales mencionadas en este ejemplo, se produce la síntesis de nuevas proteínas, que sólo se puede explicar por una expresión génica diferente, para cada una de las etapas de diferenciación de estos organismos, lo que demuestra que las condiciones del medio influyen, en última instancia, sobre la expresión génica de las células, que a su vez es la causa de la presencia en el ambiente, de nuevos productos que lo modifican.

LA INFECCION Y LA SIMBIOSIS

En algunas ocasiones los fenómenos de intercambio de información entre dos organismos que pertenecen a Reinos diferentes se inician, con procesos de interacción entre sus genomas, por ejemplo, cuando se establece la invasión de un organismo por otro, como sucede en los procesos de infección que algunas bacterias Gram negativas ocasionan en amibas cultivadas (8), a las que hacen crecer muy lentamente, les disminuyen de manera notable la capacidad para formar clones así como su tamaño, les incrementan la sensibilidad a la falta de alimento y a las temperaturas altas y en general las hacen frágiles.

Un primer resultado de esa interacción, puede ser la reproducción de la bacteria y la muerte de la amiba, sin embargo en ocasiones la amiba resiste la

infección bacteriana y se inicia un proceso de comunicación entre los dos organismos, que da por resultado una nueva forma de intercambio de información, en la que se establece una interdependencia que podría considerarse como el inicio de una simbiosis.

Este fenómeno se pudo observar por cerca de 5 años (8) en que, con base en la compatibilidad nucleocitoplásmica entre las cepas de amibas infectadas y las normales, se demostró que se había establecido un grado de interdependencia tan alto, que al transplantar un núcleo de la amiba que contenía a las bacterias simbiotes, en una amiba libre de ellas, ésta no podía sobrevivir.

Si junto con el núcleo transplantado se incluyera un poco del citoplasma de la amiba "infectada" de la que se obtuvo el núcleo, la sobrevivencia de la amiba receptora se aseguraba. Esto hace pensar que la relación se estableció por medio de alguna molécula que se encontraba en el citoplasma y que era producida por la bacteria simbiote.

Es interesante que para algunos autores, como Margulis, el proceso de simbiosis, que se inició tal vez como una infección, puede ser el mecanismo fundamental que pudo dar origen, hace aproximadamente 1,500 millones de años, a las mitocondrias y a los cloroplastos de los eucitos actuales.

Aunque no se ha identificado el tipo de información que se intercambia entre los dos organismos, se supone que es la bacteria la que produce algún mensaje, pues ésta puede ser inoculada en diferentes cepas de amibas y continuar su reproducción o bien ser cultivada *in vitro*, lo que demuestra que no ha experimentado cambios importantes en su fisiología. En este ejemplo se puede observar como la interacción entre dos genomas, produce capacidades diferentes cuando integran su información en un nuevo nivel de complejidad: la relación de simbiosis.

EL COMPORTAMIENTO DE REPRODUCCION EN LOS MAMIFEROS

En otras comunidades celulares mucho más

estables, como las que constituyen a un organismo pluricelular, por ejemplo un roedor, los fenómenos de comunicación adquieren una complejidad mucho mayor, aunque desde el punto de vista fundamental no son tan distintos a los que ya se han descrito.

Para que se pueda llevar a cabo la reproducción de las ratas, es necesario que en las hembras ocurra una serie de transformaciones fisiológicas que forman el ciclo estral, que den lugar a dos fenómenos principales: a) la maduración de los óvulos y b) el establecimiento de la conducta sexual que haga posible la fecundación de los mismos (9).

El proceso de maduración de los óvulos, se inicia a partir de las condiciones de luz y obscuridad en el medio, que inciden en un reloj biológico, que determina que un grupo de células situadas en la base del cerebro a las que se denomina efectoras neuroendócrinas, inicien la síntesis de la hormona llamada "liberadora de la hormona luteinizante", la cual hace efecto sobre la pituitaria que secreta la hormona luteinizante, que al actuar sobre los ovarios hace que maduren los óvulos e induce la secreción de estradiol, hormona que retroalimenta al cerebro y determina las condiciones que modifican el patrón de comportamiento, que permite que se lleve a cabo la cópula, que hace posible que los óvulos puedan ser fecundados y asegura la reproducción de la especie.

En este ejemplo esta incluido también el cambio en la expresión génica de las comunidades celulares que intervienen, como las de los ovarios, que responden a las señales que reciben del cerebro, inician la secreción del estradiol, que una vez que alcanza un nivel determinado se suspende, hasta recibir nuevamente el mensaje que activa a los genes responsables de su síntesis, en un sistema de retroalimentación en que participan: señales, tanto del ambiente como de las diversas comunidades de células que intervienen; receptores específicos a esas señales, transductores intracitoplásmicos, cambios de la expresión génica y modificación del comportamiento.

EL COMPORTAMIENTO EN LA COMUNIDAD

Si se toma ahora en consideración un ejemplo en

donde las unidades que se comuniquen tengan un nivel de complejidad de individuos integrantes de una comunidad de organismos, como sería el caso de un conjunto de insectos sociales, se puede encontrar un sistema de comunicación donde el número de elementos que lo componen es mucho mayor y donde se utilizan no sólo los mensajes bioquímicos, sino también un lenguaje simbólico genuinamente innato, que se adapta a los diferentes contenidos de información que se quieren transmitir y que incluye también sonidos (10).

Uno de los mejores ejemplos de este tipo de procesos de comunicación entre comunidades de organismos animales -como una colonia de abejas, que es una comunidad compacta formada por unos 50,000 individuos, cuyos miembros son altamente sociales y que por lo tanto no pueden sobrevivir sin una intercomunicación constante- lo constituye la danza que las obreras exploradoras efectúan para dar a conocer la localización de las fuentes de alimento.

En este tipo de mensaje se incluye no sólo la dirección que se debe de seguir para localizar la fuente de alimento, sino que también se aportan datos sobre el tipo de éste y acerca de la distancia que se deberá recorrer para llegar a ella y para esto se utiliza la posición del sol, es decir del punto de luz polarizada solar con valor de cero y el número de oscilaciones del abdomen que el animal efectúa al realizar sus desplazamientos, acompañados por sonidos peculiares de baja frecuencia con los que se informa de la distancia aproximada que se tendrá que recorrer para llegar al sitio donde se localizan las flores.

Todo esto expresado por medio de un sistema formado por unos cuantos símbolos, que serían equivalentes a las palabras que se utilizan en los procesos de comunicación interactiva entre los humanos y que son suficientes para que las abejas que reciben el mensaje, lo puedan interpretar de una manera eficiente, que no obstante presentar pequeñas modificaciones según la variedad a la que pertenezcan, es decir a pesar de la existencia de dialectos distintos, produce el cambio de comportamiento correspondiente, que permite que las abejas salgan, localicen la fuente de alimento y

obtengan el suficiente para asegurar la nutrición de la comunidad a la que pertenecen.

En estos organismos se completan las diferentes formas de comunicación con base en moléculas con capacidad de señal y los receptores que pueden reconocerlas por complementación estereoquímica, como es el caso de la molécula de feromona denominada geraniol, con un sistema que implica la percepción táctil y de sonido que constituye un comportamiento con valor de código, de cuya correcta interpretación depende el cambio de conducta que hace que esa información sea utilizada para obtener un elemento crucial para la sobrevivencia de la comunidad.

En este último ejemplo, los procesos de comunicación están representados por dos niveles distintos: la comunicación interactiva del lenguaje de las abejas, que permite su funcionamiento como individuos dentro de la comunidad, así como a nivel de la integración que dentro de cada individuo se establece a través del sistema neuroendócrino. En ambos casos la base de estos fenómenos sigue siendo la presencia de mensajes y receptores de diferentes calidades que permiten el intercambio de información, es decir la comunicación.

CONCLUSION

No obstante las diferencias más obvias de lo que ocurre en los fenómenos de comunicación en las bacterias, los protoctistas, los simbioses, los roedores y las abejas, es posible encontrar una serie de comunes denominadores, que demuestran las relaciones evolutivas del fenómeno de la comunicación en diferentes niveles de complejidad y que una vez más permiten determinar la unidad dentro de la aparente diversidad de los fenómenos biológicos.

Entre estos comunes denominadores se pueden señalar:

a) La influencia del ambiente: En los casos revisados, es una señal de naturaleza química como los atrayentes, los repelentes, el AMP cíclico, la Glorina; de naturaleza física como la proporción de luz y oscuridad durante el día o bien de naturaleza biológica, la que inicia el proceso correspondiente,

es decir la quimiotaxis, la migración, agregación-diferenciación, los procesos de simbiosis, el ciclo estral y la comunicación entre insectos.

b) La generación de las señales bioquímicas: Estas amplifican la información original recibida del medio y tienen efectos sobre otras comunidades celulares como: la formación de gradientes por las bacterias, las reacciones en cadena de las mixobacterias y los acraciales, el intercambio de señales entre los simbiosis, la síntesis de hormonas y neurotransmisores en las ratas y de feromonas y neurotransmisores en los insectos.

c) La presencia de receptores específicos: En la mayoría de los casos, moléculas proteicas que reconocen las señales por complementación estereoquímica y que son capaces de llevar a cabo cambios de conformación, que hacen que la información llegue hasta el citoplasma y finalmente al núcleo.

d) El cambio en la expresión génica: La que resulta de que la información haya llegado al interior celular y que en ciertos casos, incluye la síntesis de segundos mensajeros que pueden producir un efecto inmediato, como el cambio de dirección en las bacterias en su desplazamiento o a más largo plazo como en la activación de los genes en los acraciales, que darán por resultado la síntesis y liberación del AMP cíclico y la Glorina, así como la diferenciación de las células del tallo y del cuerpo fructífero, o bien la producción y liberación de las hormonas que intervienen en el ciclo estral de la rata o de las feromonas y los neurotransmisores que hacen posible la comunicación, en y entre los insectos.

e) El cambio en el comportamiento: En todos los casos, el resultado final del proceso de comunicación, es un cambio característico del comportamiento, que en las bacterias quimiotácticas implica que éstas se acerquen o se alejen de determinadas regiones del medio; en las mixobacterias y los acraciales, abandonen sus hábitos individuales y se integren a una comunidad, donde manifiestan propiedades diferentes; en los simbiosis se logre la sobrevivencia del conjunto y se adquieran características nuevas; en el caso de las ratas, la

agresividad sea substituida por la actitud que asegure la fecundación de los óvulos maduros y la reproducción de la especie y en los insectos se lleve a cabo la recolección del alimento.

Es así como es posible encontrar que entre la innumerable diversidad de los fenómenos característicos de los seres vivos, existen patrones comunes, producto de las relaciones filogenéticas, que permiten el planteamiento de generalizaciones conceptuales, como el modelo de comunicación, que hace posible comprender un poco más, el fenómeno de la evolución de la vida.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Lwoff, A (1966). *El concepto de información en la Biología molecular*. En: El concepto de información en la ciencia contemporánea, Coloquios de Rayamont. Siglo XXI editores, México, D F, quinta edición, pp 121-139.
- 2 - Carrel, A (1931). *The new Cytology*. Science **73**: 297-303.
- 3 - Pierce, J R (1972) *Communication*. Sci Am **227** (3): 30-41.
- 4 - Jones, C J y Aizawa, S-I (1991) *The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function*. Adv Microbiol Physiol **32**: 110-172.
- 5 - Stock, J B, Stock, A M y Mottonen, J M (1990) *Signal transduction in bacteria*. Nature **344**: 395-400.
- 6 - Shapiro, J A (1988) *Bacteria as multicellular organisms*. Sci Am **258** (6): 62-69.
- 7 - Booner, J T (1983) *Chemical signals of social Amoeba*. Sci Am **248** (4): 106-112.
- 8 - Jeon, K W (1972) *Development of cellular dependence on infective organisms: micrurgical studies in amoebas*. Science, **176**: 1122-1123.
- 9 - McEwen, B S (1976) *Interaction between hormones and nerve tissue*. Sci Am **235** (1): 48-58.
- 10 - Esch, H (1967) *The evolution of bee language*. Sci Am **216** (4): 96-104.

CALCIO; DE SIMPLE MINERAL A MODULADOR ESENCIAL DE SEÑALES CELULARES

Dr. Jaime Mas Oliva

Depto. de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular y Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

El elemento calcio que es reconocido como uno de los bioelementos más importantes de nuestros días, hace pocos años era solamente conocido por fisiólogos y bioquímicos como un componente del mineral óseo y como constituyente del plasma sanguíneo, con cierta importancia en la función cardíaca y la coagulación de la sangre. Únicamente, unos cuantos pioneros como lo fueron Baird Hastings y Walter Heilbrunn fueron capaces de ver más allá y predecir lo que el futuro le esperaba al ion calcio.

En la actualidad se conocen docenas de procesos, tanto extra-celulares como intracelulares, que son regulados por cambios en los niveles extra e intracelulares del calcio, al grado de considerar a este catión como el que tiene una función mucho más amplia que el propio AMP cíclico, el segundo mensajero original.

A lo largo de este tiempo de estudio, se ha reconocido que el ion calcio promueve la coagulación de proteínas, condensa a los ácidos nucleicos y daña a los orgánulos celulares; por lo que a muchos investigadores les ha resultado interesante preguntar, ¿qué función tuvo el ion calcio en el inicio de la vida? A este respecto existe la propuesta de que las células primordiales vivieron en un "mar" donde la concentración de calcio se encontraba por debajo de μM . Esta hipótesis ha sido apoyada en vista de que probablemente en este estadio, las rocas expuestas fueron principalmente volcánicas y por lo tanto el calcio no se encontraba en forma biodisponible. Solamente fuerzas climáticas, químicas y biológicas permitieron un aumento gradual en la concentración del calcio en el medio ambiente. En estas condiciones y con la finalidad de prevenir lo que podríamos llamar como el holocausto del calcio, para hacer analogía con el holocausto del

oxígeno, estas células primordiales tuvieron la necesidad de desarrollar sistemas de control y así poder mantener una concentración baja de calcio en sus espacios intracelulares, para así evitar el conocido y ampliamente documentado daño celular, ocasionado por las concentraciones elevadas del calcio en el espacio intracelular.

Una característica fundamental de esta hipótesis evolucionista, consiste en que a lo largo de la evolución ha existido siempre una relación absoluta entre la fisiología celular y la necesidad de que las células regulen su interacción con los factores físicos, químicos y biológicos. Por lo tanto, la evolución ha seleccionado mecanismos bioquímicos muy eficientes para modular las concentraciones intracelulares del ion calcio y así permitir su intercambio a través de la membrana cuando la célula lo requiere.

El ion calcio ha sido aceptado como agente de relevancia universal, debido a que controla un gran número de funciones celulares. Entre éstas, la síntesis y liberación de hormonas, el movimiento celular y gran cantidad de procesos asociados a la membrana. La señal de entrada del ion calcio requiere del mantenimiento de una muy baja concentración del mismo dentro de las células, y de mecanismos que aseguren su presencia en la vecindad de las moléculas blanco.

Dentro del metabolismo celular, la mayoría de las moléculas consideradas como de señal, son reguladas durante su biosíntesis o degradación; sin embargo, la evolución también ha seleccionado un mecanismo de control muy diferente que utiliza complejos o uniones reversibles entre el calcio y varias proteínas específicas. Estas proteínas consideradas como amortiguadoras del calcio intracelular y que se encuentran a concentraciones

de hasta 10,000 veces por arriba de la que se encuentra en el espacio extracelular, han demostrado jugar un papel muy importante en la regulación del metabolismo celular.

Aunado a que estas proteínas solubles de alta afinidad por el calcio contribuyen a la amortiguación del catión, también presentan una función secundaria adicional muy importante consistente en la aparición de regiones hidrofóbicas en su superficie. Este cambio conformacional en la proteína permite la importante interacción del complejo proteína/calcio con las diferentes proteínas blanco, por ejemplo, enzimas. De esta manera pueden considerarse a estas proteínas, como lo son la calmodulina y la troponina C, como procesadores esenciales de la señal del calcio más que de amortiguadores del calcio intracelular.

Sin embargo, las limitaciones en la función de amortiguamiento del ion calcio descritas anteriormente para las proteínas solubles, no son aplicables a las proteínas unidoras de calcio intrínsecas de la membrana. Estas proteínas acomplejan calcio de un lado de la membrana y lo transfieren hacia el otro de manera continua; así eliminan los problemas que pudieran surgir de una cantidad insuficiente de proteína disponible. Por lo tanto, las proteínas intrínsecas de membrana unidoras de calcio, mantienen un papel preponderante en la capacidad de amortiguamiento intracelular del ion calcio, no exclusivamente por la unión, sino por la capacidad que presentan de unir y desplazar al catión constantemente.

Las diferentes células eucariotas poseen sistemas unidores y transportadores de calcio en la membrana plasmática, así como en la membrana de los diferentes orgánulos intracelulares. Estos sistemas transportadores de calcio operan con diferentes propiedades cinéticas que responden a las diversas demandas del ciclo funcional de las células; en algunas ocasiones éstas pueden ser rápidas, precisas y de regulación de muy alta afinidad; mientras que en otras, son de baja afinidad y con una regulación más lenta. Como se muestra en la figura 1, las membranas de las diferentes células eucariotas contienen distintos sistemas membranales de transporte del calcio, pero solamente cuatro sistemas transportadores son conocidos hasta el momento:

ATPasas, intercambiadores, canales y translocadores electroforéticos. La regulación del calcio con alta afinidad depende obligatoriamente de las ATPasas, mientras que la regulación de baja afinidad es llevada a cabo por los otros dos sistemas mostrados en la figura 1, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el canal de calcio dependiente de voltaje.

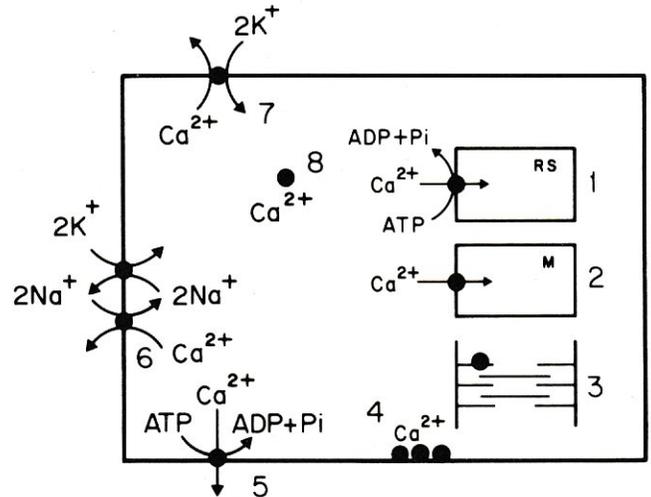


Figura 1. Mecanismos de salida del ion calcio del citoplasma hacia los orgánulos intracelulares y el espacio extracelular: 1) retículo sarcoplásmico; 2) mitocondria; 3) sistema miofibrilar; 4) sitios de pegada en la membrana plasmática; 5) ATPasa de Ca^{2+} ; 6) intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ acoplado a la ATPasa de Na^+, K^+ ; 7) intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ y 8) sitios de unión a moléculas citoplásmicas.

De no existir los dos mecanismos de salida para el ion calcio descritos a nivel de la membrana plasmática, este catión se acumularía en el espacio intracelular y podría ser perjudicial para la célula en una variedad de circunstancias. Un aumento en la concentración del calcio citoplásmico, por ejemplo, activaría proteasas y fosfolipasas y la mitocondria dejaría de producir ATP con el consiguiente desbalance energético, llevando a la célula a un daño irreversible y a la muerte.

La figura 2 muestra la secuencia de acontecimientos que se observan en la estructura de una célula muscular cardíaca aislada cuando ésta pierde el control de su concentración de calcio intracelular. La secuencia muestra la franca contractura y la desaparición de la fina estructura membranal, lo que lleva a la célula a la pérdida total del control de su homeostasis y a la muerte.

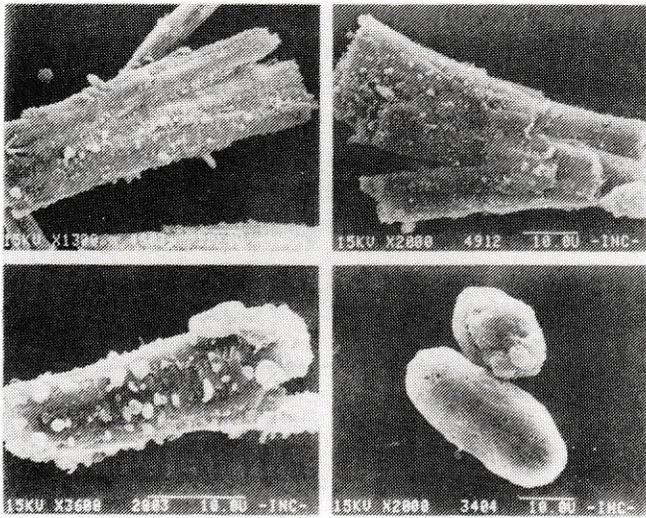


Figura 2. Secuencia de acontecimientos que muestran a una célula muscular cardíaca aislada perder su estructura normal al agregar en el medio de incubación el ionóforo para calcio A23187. La concentración de calcio en el medio de incubación es de 2 mM. Las fotomicrografías fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido. Arriba izquierda, célula en condiciones basales en ausencia de A23187. Arriba derecha, 20 segundos después de la adición del ionóforo. Hay que notar la contractura y pérdida de la definición de superficie. Abajo izquierda, 2 minutos de la adición del ionóforo. Importante contractura y pérdida de la arquitectura normal del miocito. Abajo derecha, 3 minutos de la adición de A123187. Daño totalmente irreversible dado por la presencia de calcio en el medio. Los controles a lo largo del experimento en ausencia del ionóforo, no mostraron cambios.

Sistemas de Transporte de Calcio en la Membrana Plasmática (Fig. 3)

El Canal de Calcio

A pesar de ser conocido desde hace tiempo el canal del calcio, que es básicamente responsable de la entrada de calcio a las células, sólo de manera inicial ha sido caracterizado a nivel molecular. En este sentido, la técnica de fijación de voltaje, en microáreas de membrana, ha permitido el estudio de la actividad de canales unitarios y ha llevado a la definición de sus parámetros cinéticos. El estudio de las corrientes de este canal unitario de calcio ha revelado que tiene una conductancia de entre 15 y 25 pS, lo que corresponde a un paso de iones de calcio de alrededor de 3×10^6 por segundo. La densidad del canal de calcio es particularmente alta en las membranas tubulares T de los músculos

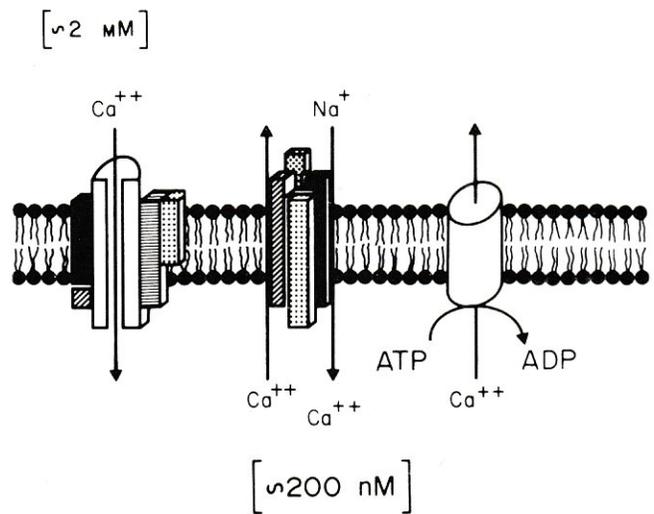


Figura 3. Diagrama de los tres sistemas transportadores de calcio de la membrana plasmática. El canal de calcio, el transportador sodio/calcio y la bomba o ATPasa de calcio.

esqueléticos, por lo que este tejido ha sido el de elección para el aislamiento del canal. Los canales son controlados por un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática, los que empiezan a abrirse a un potencial transmembranal basal de 40 mV. Estos canales son bloqueados por los llamados antagonistas del calcio, los cuales han auxiliado enormemente en el avance del conocimiento del canal de calcio y recientemente han permitido el aislamiento del receptor a dihidropiridinas en este canal y a la determinación de su estructura primaria.

Otro aspecto interesante del canal de calcio es su conocida estimulación por neurotransmisores adrenérgicos. Los experimentos que utilizan la técnica de fijación de voltaje en membranas plasmáticas de corazón han mostrado que el AMP cíclico aumenta la probabilidad de apertura de este canal. Las propiedades descritas hasta el momento se refieren a uno de los subtipos que actualmente se conocen del canal que corresponde al tipo L. Sin embargo, recientemente se han reconocido varios tipos diferentes con propiedades distintas. Dos de éstos han sido identificados por experimentos de fijación de voltaje en corazones de mamíferos incluso el más común que es el tipo L, sensible a las dihidropiridinas y donde su apertura produce corrientes de larga duración. Los canales del tipo T

abren a potenciales transmembranales más negativos y son insensibles a las dihidropiridinas, por lo tanto producen corrientes de duración más corta.

El intercambiador sodio/calcio (Fig. 3).

El intercambiador sodio/calcio es uno de los dos sistemas exportadores de calcio conocidos de la membrana plasmática, presenta una gran capacidad de transporte, pero con una muy baja afinidad por el ion calcio, esto particularmente en tejidos excitables. Este sistema ha sido estudiado esencialmente en corazón y en el axón gigante del calamar. Los trabajos electro-fisiológicos, ya clásicos, han establecido que este sistema opera electronegativamente e intercambia tres iones sodio por uno de calcio. No sólo responde a los gradientes de sodio y calcio, sino también al potencial eléctrico transmembranal. Los trabajos recientes en que se utilizan vesículas sarcolemas del músculo cardíaco, han demostrado que este sistema transportador presenta una baja afinidad por el calcio (K_m , 1 a 20 μM) pero con una capacidad máxima de transporte de calcio en corazón de 20 nmoles por mg de proteína sarcolemal por segundo. La baja afinidad del sistema por calcio es intrigante, ya que la concentración del calcio libre en el citosol aparentemente nunca se incrementa por arriba de 10 μM . Posiblemente sin embargo, los parámetros cinéticos del intercambiador en vesículas aisladas, son diferentes a los que presentan tejidos intactos. En este contexto puede ser importante la activación del intercambiador por una cinasa que cataliza al proceso de fosforilación y disminuye su K_m por calcio hasta alrededor de 1 μM .

La Bomba o ATPasa de Calcio (Fig. 3)

La ATPasa de calcio de la membrana plasmática interacciona con el ion calcio con una muy alta afinidad (K_m alrededor de 0.5 μM); sin embargo, presenta una capacidad de transporte de calcio baja (alrededor de 0.5 nmoles x mg de proteína membranal por segundo, en tejidos cardíacos). La alta afinidad por calcio sugiere, que esta enzima exporta calcio al espacio extracelular aún cuando las concentraciones de este ion en el citosol (estado basal) se encuentran a un nivel submicromolar. Por lo tanto, la ATPasa de calcio muy probablemente

juega un papel crítico en el mantenimiento del gradiente de calcio a través de la membrana plasmática de las células.

La enzima es considerada una ATPasa de la clase P, esto es que forma un aspartil fosfato durante su mecanismo de reacción, el cual es inhibido por vanadato. La figura 4 ilustra la secuencia del ciclo de la reacción de la ATPasa de Ca^{2+} , propuesta para el eritrocito y sarcolema de músculo cardíaco, aparentemente también aplicable a las ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática de otros tipos celulares. Básicamente, en este esquema la enzima presenta dos diferentes conformaciones llamadas estados E^1 y E^2 . Aparentemente estas dos conformaciones tienen diferentes afinidades por el ion calcio, así como una orientación distinta en el plano de la membrana. Esto es, presenta el sitio de alta afinidad al calcio orientado hacia el interior y la forma de baja afinidad orientado hacia el exterior.

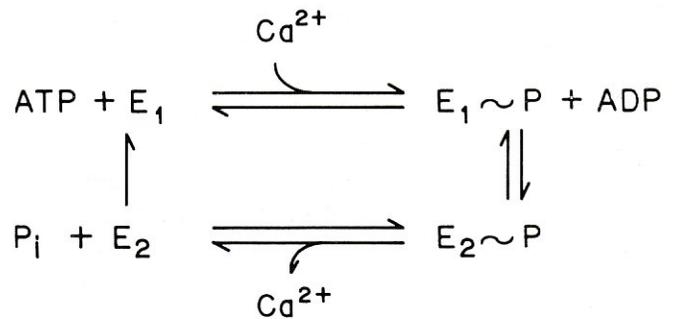


Figura 4. Ciclo catalítico básico de la bomba o ATPasa de calcio de la membrana plasmática.

La reacción de formación de E_1P es endergónica, pero debido al carácter fuertemente exergónico del paso $E_2P \rightarrow E_2 + P_i$, la reacción se realiza principalmente en dirección de la formación de $E_2 + P_i$. Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha comprobado la reversibilidad del ciclo y por primera vez, se ha descrito el control efectuado por la molécula moduladora calmodulina en esta reacción en reversa. Mientras una baja concentración de calcio favorece la reacción de hidrólisis del ATP, la reacción en reversa es favorecida por utilizar concentraciones altas de calcio entre 1 y 3 mM. Por lo tanto, con una alta concentración de calcio, la síntesis del ATP se induce a partir de (^{32}P)- P_i

y ADP, la cual puede ser medida experimentalmente como un intercambio ATP--Pi, o bien mediante la formación de los compuestos intermediarios fosforilados a partir del (³²P)--Pi.

En relación con el esquema catalítico básico presentado antes y desde un punto de vista puramente bioenergético, la ATPasa de Ca²⁺ aventaja a los sistemas clásicos utilizados en el estudio de los mecanismos moleculares de transducción de energía. La ventaja se debe a que esta ATPasa presenta un papel funcional relativamente simple y una regulación menos compleja que los sistemas membranales de gran complejidad estructural. Al tomar en cuenta las nuevas perspectivas del concepto de transducción de energía aplicado a las membranas plasmáticas, uno de nuestros intereses en el laboratorio se enfoca al estudio de los procesos que modulan ambas direcciones del ciclo catalítico de la ATPasa de Ca²⁺, y a la regulación de la transformación de energía por esta molécula, para así integrar nuestros recientes hallazgos cinéticos a la función principal de estas moléculas, que es la del transporte del calcio.

Esta ATPasa consiste en un polipéptido de alrededor de 140 KDa, el cual puede ser reconstituido en liposomas con una eficiencia de transporte óptima. Los sistemas liposomales han permitido establecer que la ATPasa transporta calcio con una estequiometría de 1 a 1 en relación con la hidrólisis del ATP. Se ha observado que un proceso de fosforilación dependiente de AMP cíclico estimula a la ATPasa y al bombeo de calcio, por lo que el efecto causado por el AMP cíclico ha sido considerado como el de incrementar de manera total el flujo de calcio en la membrana plasmática en ambas direcciones, más que el de estimular unidireccionalmente el transporte de calcio.

Los trabajos realizados con la ATPasa de calcio purificada, han establecido que la enzima puede ser estimulada por diferentes tratamientos alternativos a la estimulación por calmodulina, entre los cuales se encuentran: la exposición a fosfolípidos ácidos, ácidos grasos polinsaturados y a la acción de proteólisis controlada por un número bien establecido de proteasas. El trabajo realizado con proteólisis aunado a la utilización de técnicas de secuencia química y de DNA recombinante ha sido

importante en el establecimiento de la estructura primaria de la enzima, así como en el reconocimiento de los diferentes dominios funcionales de la enzima.

La bomba contiene 1,220 aminoácidos, lo que corresponde a un peso molecular de 14,683. El ácido aspártico, número 475, forma el acilfosfato durante el ciclo catalítico; y la lisina, número 601, une al antagonista del ATP isotiocianato de fluoreceína. La región que une a la calmodulina ha sido identificada próxima al carboxilo-terminal (residuos 1,100 a 1,127) por medio de reactivos bifuncionales fotoactivables. La secuencia traducida de la ATPasa contiene en sus regiones L y C de la parte unidora de calmodulina, secuencias que son muy ricas en ácido aspártico y ácido glutámico, lo que imprime a estas secuencias cierta homología con la calmodulina. Esta última característica puede ser importante en el esclarecimiento de los sitios de unión del calcio, así como de regulación de la interacción de la calmodulina con la bomba. La bomba también contiene próxima a su región N-terminal, dos regiones de 11 aminoácidos (residuos 22 a 33 y 310 a 321) que pueden formar sitios de unión para calcio. Han sido identificadas diez regiones hidrofóbicas, que muy probablemente se encuentran contenidas en asociación con la membrana, de las cuales cuatro están localizadas en la región N-terminal y 6 en la porción C-terminal de la ATPasa. La región medial de la bomba (alrededor de 500 residuos) no contiene regiones hidrofóbicas. La serina 1,178, localizada en la región C-terminal del fragmento que une a la calmodulina puede ser fosforilada por una proteína cinasa dependiente de AMP cíclico, fenómeno que aumenta la afinidad de la bomba de calcio. Un esquema de la arquitectura propuesta para esta proteína en la membrana plasmática, se muestra en la figura 5.

Por otro lado, se han realizado considerables avances en el papel que juegan los inositol fosfatos en el control de los niveles intracelulares del calcio; sin embargo, aún no contamos con un esquema molecular completo que nos lleve del fenómeno de iniciación mediada por el ion calcio a la respuesta terminal. Por ejemplo, conocemos las bases en la liberación del calcio intracelular y el movimiento de este catión a través de canales; sin embargo, aún no contamos con métodos satisfactorios para medir la concentración libre del ion calcio en los diferentes

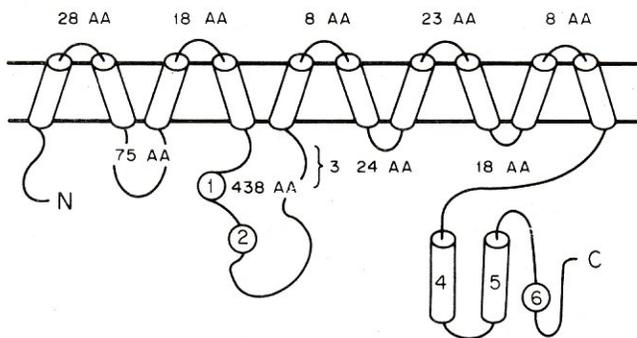


Figura 5. Diagrama de la organización molecular de la bomba de calcio de la membrana plasmática: 1) sitio activo ($-^{32}\text{P}$); 2) sitio de unión a FITC (isotiocinato de fluoresceína); 3) zona de la bisagra 4) zona propuesta para la unión del ion calcio; 5) zona propuesta para la unión de la calmodulina; 6) sitio de fosforilación dependiente del AMP cíclico.

orgánulos y microambientes, y aún menos para manipular estas concentraciones. En este sentido, un esfuerzo importante se está desarrollando mediante la utilización de compuestos que al unirse con calcio fluorescen. De esta manera se ha iniciado el estudio de los flujos y “mareas” del calcio en células intactas.

Durante el primer siglo de estudio de los efectos del ion calcio en el interior de una célula, cientos de científicos han contribuido con su conocimiento a dilucidar los secretos de la acción biológica de este catión.

Durante los años venideros, donde muy

probablemente este conocimiento será multiplicado, las brillantes palabras de Bertrand Rousell animan a continuar en el estudio de este fenómeno.

“In art nothing worth doing can be done without genius, in science even a very moderate capacity can contribute something to a supreme achievement”.

Agradecimientos:

Las publicaciones del autor discutidas en el presente trabajo han sido parcialmente apoyadas por CONACyT. Por su colaboración con el material gráfico, agradezco a la D.I. Cristina Celis y por su ayuda secretarial a la Sra. Ma. Elena Gutiérrez.

Lecturas Recomendadas:

- *Biochemical Approaches to Cellular Calcium* (Eds. Eric Reid, G.M.W. Cook & J.P. Luzio) Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis Vol. 19. Royal Society of Chemistry U.K. (1980)
- *The Role of Calcium in Biological Systems* (Eds. Leopold J. Anghileri & Anne M. Tuffet-Anghileri) Vol. 1 CRS Press Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. (1982)
- Carafoli, E. y Penniston, J.T. (1985). *The Calcium Signal*. *Sci.* **253** (5) 50-58.
- Llinás, R.R. (1982). *Calcium in Synaptic Transmission*. *Sci. Ann.* **247** (4): 38-47.
- Maloney, P.C. y Wilson, T.M. (1985). *The Evolution of ion Pumps*. *Bioscience* **35** (1): 43-48.

REUNION ACADEMICA DE FUNDACION DE LA ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA, A.C.

Dentro de la historia natural del proceso de la comunicación de la enseñanza de la bioquímica en nuestro país, las actividades fueron iniciadas en 1974 por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, con el Taller de Actualización Bioquímica y unos años después con la colección de Mensaje Bioquímico; esta labor fue continuada después con la publicación trimestral del Boletín de Educación Bioquímica, cuyo primer número apareció en marzo de 1982, editado por un

grupo de profesores convencidos de las bondades y posibilidades de este hecho.

Diez años más tarde surgió la necesidad de consolidar la integración de la comunidad en esta área, y así los editores del BEB nos echamos auestas la empresa de fundar una sociedad en la que todos tengamos participación y posibilidades de ser oídos, de presentar nuestras inquietudes, nuestros logros en la docencia del campo que nos ocupa y al

mismo tiempo un sitio de pertenencia para los que transmitimos el conocimiento de esta ciencia en el país. Se pretende que su seno sea el foro natural para concretar las metas de superación académica que los profesores de bioquímica a nivel nacional requerimos.

De esta manera del 4 al 7 de octubre próximo pasado se realizó la primera reunión de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., actividad que se realizó conjuntamente con el XIX Taller de Actualización Bioquímica, en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. En el desarrollo de estas actividades, la primera organizada por la Asociación recién fundada de la que es Presidente el doctor Enrique Piña Garza y la segunda por el Departamento de Bioquímica de la propia Facultad, al frente del cual se encuentra el doctor Jaime Mas Oliva como Jefe de Departamento; se revisaron algunos temas en los que es indispensable que los profesores de bioquímica de nuestro amplio territorio se mantengan actualizados, dada la velocidad con la que se genera el conocimiento, además de la expansión de la bioquímica en áreas centrales como son la biología molecular, la bioenergética y la genética, entre otras, sumado todo esto a las características propias de producción y divulgación del conocimiento.

Los temas que se abordaron en esta reunión académica fueron “El origen de la vida, un problema de protobioquímica” desarrollado por el doctor Jesús Manuel León Cázares del Instituto de Fisiología Celular y de la Facultad de Ciencias de la UNAM; “Oportunidades y retos de las universidades en su vinculación con el sector industrial” sostenido por el doctor Jaime Martuscelli Quintana del Centro para la Innovación Tecnológica de la UNAM; “La práctica no salió...” dirigido por el doctor Alberto Hamabata de la Facultad de Medicina, UNAM y del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN; “La evolución de las proteínas” por el doctor Alberto Huberman del Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán”; “Mecanismos de resistencia bacteriana a iones inorgánicos tóxicos” presentado por el doctor Carlos Cervantes del Instituto de Investigaciones

Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; “Aislamiento y caracterización del DNA” dirigido por los doctores Jaime Mas Oliva, Alicia Cea Bonilla y Celia Virginia Sánchez Meza de la Facultad de Medicina de la UNAM; “El proyecto del genoma humano” por el doctor Jesús Rubén Garcilaso Pérez de la Universidad de Sonora y el “Taller de evaluación de programas de enseñanza en bioquímica” conducido por el doctor Enrique Piña Garza y por quien firma este documento, también de la Facultad de Medicina de la UNAM.

En la reunión predominó el espíritu académico, se hicieron planes a largo plazo, como por ejemplo: la posibilidad de tener un programa general único de bioquímica básica, se vió la necesidad de trabajar en la revisión de temas de actualidad, el estudio para ofrecer en nuestras prácticas verdaderas posibilidades de aprendizaje para nuestros estudiantes, etc.; por otro lado se vió la disponibilidad de algunos profesores para presentar en futuras reuniones diversos temas, de otros el ofrecimiento de dar a conocer la existencia de la Asociación en sus respectivas universidades, otros de los socios expresaron su necesidad de ser apoyados por la Organización en casos muy concretos; en fin, fue para todos notorio que la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., viene a cubrir un hueco en las relaciones académicas de aquellos que enseñamos ésta o ciencias afines y las universidades en las que laboramos.

Después de tres días de trabajo y con la asistencia de más de cien socios fundadores, tres de ellos representan a otros tantos países latinoamericanos, Cuba, Ecuador y Guatemala, el doctor Enrique Piña Garza clausuró la Reunión mencionando al final su complacencia, pues con el inicio de nuestra Asociación se posibilita el buen desempeño integral de aquellos que nos dedicamos a esta rama de la ciencia tanto a nivel nacional como internacional.

*Yolanda Saldaña de Delgadillo
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM.*

LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO

invita a su

PRIMER CONGRESO NACIONAL

El cual tendrá lugar en el Auditorio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, del 8 al 11 de junio de 1993.

Informes:

CINVESTAV 752 0677 y 754 02 00 ext. 5222 y 5123

FAX 754 6804 (Dr. Oscar Ramírez Toledano, Bioquímica)

FAX 752 6106 (Dr. José Luis Reyes, Fisiología)

Instituto de Fisiología Celular, UNAM. 622 5616 Y 622 5615 FAX 622 5607 (Dra. Graciela Meza, Neurociencias)

XX TALLER DE ACTUALIZACION BIOQUIMICA

A todos los profesores de bioquímica de las universidades del país.

El Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, invita a todos los profesores de bioquímica, a participar en el **XX Taller de Actualización Bioquímica** que se realizará del 5 al 8 de septiembre de 1993 en el Palacio de la Escuela de Medicina, UNAM. Este taller junto con el Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., que se realizarán en forma seriada, constituyen la "SEMANA DE LA EDUCACION BIOQUIMICA"

Para mayores informes dirigirse a los miembros del Comité Organizador: Dras. Yolanda Saldaña de Delgadillo, Sara Morales López y Patricia del Arenal Mena; al Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apdo. Postal 70-159, C.P. 04510 México, D.F. y al teléfono y fax 548 3957.

LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA, A.C.

convoca a investigadores, profesionales y empresarios a participar en el

V CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA

a celebrarse del 5 al 9 de septiembre de 1993 en Puerto Vallarta, Jal.

El programa científico incluye conferencias presentadas por especialistas nacionales e internacionales dentro de las áreas de incidencia de la biotecnología moderna, además de mesas redondas, simposia, sesiones de trabajos libres, presentaciones en carteles y cursos precongreso.

Temas de incidencia en Biotecnología

Farmacéutica
Alimentaria
Industrial
Agropecuaria
Ambiental
Salud

Informes y solicitud de formatos para trabajos libres:

Dra. Amanda Gálvez y Dra. Amelia Farrés.
Depto. Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química, UNA. Edificio "E", Lab. 312, Ciudad Universitaria. México, D.F. 04510. Tel. (5) 622-5306. Fax. (5) 548-3227

FECHA LIMITE PARA RECEPCION DE TRABAJOS LIBRES: 19 DE ABRIL DE 1993.

LA ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA, A.C.

convoca al
II CONGRESO
de la Asociación con el tema
INNOVACION DOCENTE EN BIOQUIMICA

a realizarse en el Palacio de la Escuela de Medicina, UNAM (Cd. de México), los días 9 y 10 de septiembre de 1993, a continuación del XX Taller de Educación Bioquímica (5 al 8 de septiembre) y que en su conjunto constituyen la "SEMANA DE LA EDUCACION BIOQUIMICA".
Recepción de trabajos para su presentación, inscripciones y mayores informes:

Aída Hernández Tobías
Asoc. Mex. de Prof.de Bioquímica
Apdo. Postal 70-281
México, D.F., C.P. 04510 MEXICO
Tel. 6 23 21 68
FAX: 5 48 39 57

Edmundo Calva
Tel. 752 06 77 ext. 5231
FAX 754 68 04

Dr. Enrique Piña
Asoc. Mex. de Prof. de Bioquímica
Apdo. Postal 70-281
México, D.F., C.P. 04510 MEXICO
Tel. y FAX 548 39 57

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
VI REUNION NACIONAL DE BIOQUIMICA VEGETAL
Octubre 10-14 de 1993. Morelia, Michoacán

TEMAS:

Conferencia Magistral
6 sesiones plenarias.
6 simposia.
Exposición de carteles.

Metabolismo Secundario.
Interacciones Planta-Microorganismo.
Fitorreguladores.
Fisiología y Desarrollo.
Estrés.
Bioenergética.

CURSOS PRECONGRESO:

- a) CULTIVO DE TEJIDOS.
- b) BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS.

INFORMES:

DRA. EVA SORIANO B.
TEL. Y FAX. 91 (43) 14-21-52
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUIMICO-BIOLÓGICAS, UMSNH.
MORELIA, MICH.

DRA. ESTELA SANCHEZ DE J.
TEL. 91 (5) 550-91-96
DPTO. DE BIOQUIMICA,
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM
MEXICO, D.F.

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, México 04510, Coyoacán, D.F. Tiraje: 2,000 ejemplares.

VIII CONGRESO DE BIOENERGETICA Y BIOMEMBRANAS

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA, A:C:

Del 7 al 11 de noviembre de 1993
Hotel Hacienda Cocoyoc, Morelos

Entrega de Material
para resúmenes:

25 de junio al 2 de julio de 1993

Recepción de resúmenes
para presentación:

31 de agosto de 1993

Comité Organizador:

Luis González de la Vega
CINVESTAV-Irapuato
I.P.N.
Apdo. Postal 629,
Irapuato, Gto. 36500
Tel: (462) 516-00
FAX: (462) 5-1282

Federico Martínez
Depto. de Bioquímica
Facultad de Medicina
U.N.A.M.
Apdo. Postal 70.159
04510 México D.F.
Tel. 623-2170

Jaime Mas Oliva
Instituto de Fisiología Celular
Apdo. Postal 70-243
04510 México, D.F.
Tel: 622-56-20 FAX:622-56-11

AVISO URGENTE A LOS CORRESPONSALES DE PROVINCIA Y A LOS SUSCRIPTORES QUE DESEEN INCORPORARSE A ESTAS FUNCIONES

BEB BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

COMITE EDITORIAL

Teléfono 622 56 37
Fax 548 03 87
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Fax 548 39 57
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM

MEXICO, D.F. MARZO 31 DE 1993

A LOS CORRESPONSALES DE PROVINCIA

Presentes

Por este conducto, nos permitimos hacer de su conocimiento que este Comité acordó extenderles una invitación *URGENTE*, para que se sirvan incorporarse, en su calidad de integrantes del mismo, a las labores editoriales que para este año, se ha propuesto llevar a cabo.

Para tal fin, les solicitamos de la manera más atenta, el envío de trabajos y notas para publicación, así como de los avisos y demás información que ustedes consideren pertinente.

En espera de su colaboración aprovechamos para enviarles un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
El Comité Editorial

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 de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTICULOS DE REVISION

- 1) El artículo deberá enviarse en un disco flexible de 5 1/4 pulgadas de 365 KB de capacidad, escrito en el procesador de textos "Word 5", sin ningún formato y con una extensión máxima de 18,000 caracteres. Este deberá ir acompañado de dos impresiones del artículo en el que se marcarán en color las palabras o líneas que deban ir en *cursivas* o **negritas**, así como todas las anotaciones necesarias. En el caso de no tener acceso a este procesador, el manuscrito podrá enviarse mecanografiado, con una extensión que no exceda de 12 cuartillas escritas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por renglón).
- 2) Se deberá incluir un resumen de más o menos diez renglones, que deberá ir seguido por un conjunto de tres a seis palabras clave, que se usarán como código en el catálogo internacional.
- 3) Se sugiere un máximo de diez referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas en el texto de forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada una debe contener: nombres de los autores, año de publicación entre paréntesis, título del artículo, nombre de la revista, número del volumen en *cursivas* y antecedido por dos puntos el número de la primera y última páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:

Miller, C. O. (1982) Cytokinin Modification of Mitochondrial Function. *Plant Physiol* 69: 1274-1277.

Los libros deberán citarse de la siguiente forma:

Larckins, B. A., Peralmutter, N. L. y Hukman, 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

- 4) Se aceptarán como máximo seis figuras o tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localización

deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y de referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta, las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros.

- 5) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de página. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen 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, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, etc.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica en el inciso I-1.
- 4) Se aceptarán un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto. En casos de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una 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 así como las pruebas de página se comunicarán al primer autor.

Los discos y las dos copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apdo. Postal 70-281, México 04510, D. F., o al Dr. Alberto Hamabata, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apdo. Postal 14-740, México 07000, D. F., o bien a través del corresponsal del BEB en su localidad.