ISSN 0187/294X

BEB 93
BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

VOL. 12 No. 2 JUNIO 1993

EDITORIAL

LA BIOLOGIA DEL DESARROLLO EN MEXICO

A nivel nacional y solamente desde este siglo, puede rastrearse el inicio de la biología del desarrollo formalmente, con los estudios pioneros en embriología de las Dras. Amelia Sámano en la Universidad Nacional Autónoma de México y Ma. Victoria de la Cruz en el Instituto Nacional de Cardiología por las décadas de 1940 y 1950. La Dra. de la Cruz, cubana avecindada en México y en cierta medida discípula de la eminente Mary Rawles, embrióloga experimental de la Carnegie Institution of Washington, tuvo la visión de impulsar la formación de jóvenes profesionistas biólogos y médicos en la biología del desarrollo moderna, la cual desde luego incluía la bioquímica del desarrollo, de moda internacional con el Profesor Jean Brachet en la década de 1960.

Los dos primeros cursos de graduados de bioquímica del desarrollo en el país, se ofrecieron, uno en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México en 1966 y otro en 1968 en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, el cual desde entonces es parte del *currículum* de la Sección de Graduados de la escuela y que ofrece ahí el Departamento de Bioquímica.

A partir de esos inicios y en participaciones en congresos de nuestras sociedades nacionales del área biológica, nuestros colegas interesados en la biología del desarrollo progresivamente fueron conformando la masa crítica necesaria para fundar en 1992, una sociedad de especialistas en esta disciplina. La fundación no ha sido gratuita, pues el ser pionero en cualquier actividad tiene un costo elevado.

Nuestra Sociedad Nacional se ha nutrido con la experiencia creciente de colegas provenientes de ésta y de otras disciplinas afines, lo que es propio de su carácter científico.

Los antecedentes académicos formales de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo, son las cuatro Jornadas que sobre esta disciplina han venido efectuándose cada cuatro años desde 1979, con un número creciente de trabajos presentados. En las IV Jornadas de 1991, durante el mes de junio, las 71 presentaciones conmemoraron el XXX Aniversario de la creación del CINVESTAV. En ese mismo año, contando con los auspicios de la Coordinación de la Investigación Científica de la UNAM y la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, se

Pasa a la pág. 35

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 Zubirán"

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

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

INDICE

BEB 93 Vol. 12 Num. 2 Junio 1993

EDITORIAL

LA BIOLOGIA DEL DESARROLLO EN MEXICO
Oscar Ramírez Toledano.....33

ARTICULOS

INESTABILIDAD GENETICA EN MICRO-ORGANISMOS DE INTERES INDUSTRIAL
Amelia Farrés.....35

EL PAPEL DEL COLESTEROL EN LOS PROCESOS TUMORALES
Federico Martínez, Oscar Flores Herrera, Juan Pablo Pardo, Guillermo Mendoza Hernández y Ma. Teresa Espinosa García.....41

PAPEL DE LA ACTIVIDAD NEURONAL EN LA DIFERENCIACION CELULAR
Julio Morán.....46

AVISOS

V CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA.....53

"SEMANA DE LA EDUCACION BIOQUIMICA" XX TALLER DE ACTUALIZACION BIOQUIMICA...54

II CONGRESO DE LA ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA, A.C.....54

VI REUNION NACIONAL DE BIOQUIMICA VEGETAL.....54

VIII CONGRESO DE BIOENERGETICA Y BIOMEMBRANAS.....55

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA.....56

Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.

Facultad de Medicina, UNAM

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

Viene de la pág 33

LA BIOLOGIA DEL...

publicó el primer libro mexicano sobre un aspecto específico de la biología del desarrollo: La Ontongenia Neural. Este libro, editado por el Dr. Manuel Salas, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, abarca los aspectos comparados y los mecanismos de regulación durante la génesis del sistema nervioso y es el producto de la investigación de alrededor de 30 colegas, todos interesados activamente en la biología del desarrollo.

No cabe duda que una vez que la masa crítica de investigadores nacionales en esta disciplina logró que ésta tuviera expresión propia, la actividad académica nacional se ha ido multiplicando y conectando con áreas afines, cultivadas en el territorio nacional y en el extranjero.

Algunos de los miembros de esta sociedad, de reciente creación formal, nos congratulamos al ver entre nuestras filas a colegas de toda el área biológica nacional, sin distinción de procedencia de disciplina, tal como debe ser en principio la biología del desarrollo.

En este año deberá celebrarse, por vez primera en el territorio nacional, el Primer Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo, fundada en México, D. F. el 14 de enero de 1992, con socios representantes de varias universidades de nuestra provincia, además de los del área metropolitana local.

Dr. Oscar Ramírez Toledano
CINVESTAV, IPN

INESTABILIDAD GENETICA EN MICROORGANISMOS DE INTERES INDUSTRIAL

Amelia Farrés. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, 04510 México, D.F.

RESUMEN

Los microorganismos generalmente heredan sus características en forma estable de una generación a otra. Sin embargo, múltiples factores pueden provocar la pérdida de sus propiedades. Algunas características son inestables por la posibilidad de variación natural debida a los agentes mutagénicos ambientales, a los errores inherentes al metabolismo de duplicación o a fenómenos de recombinación legítima o ilegítima. El fenómeno de inestabilidad se acentúa cuando los genes de interés están codificados en plásmidos. Las técnicas de manipulación de los ácidos nucleicos *in vitro* generan microorganismos igualmente susceptibles a estos fenómenos pero, en ocasiones, pueden contribuir a estabilizar características al incorporar los genes respectivos a los cromosomas.

Palabras Clave: Inestabilidad genética, variación genética.

1. INTRODUCCION

Los microorganismos son fuente de numerosos metabolitos de interés en varios sectores industriales. Sin embargo, el término microorganismo abarca grupos taxonómicamente divergentes, como son bacterias, cianobacterias, algas, levaduras y hongos filamentosos. Las constituciones genómicas de estos grupos han venido descifrándose en los últimos años y entre ellos se presentan diferencias de estructura, organización y comportamiento, que deben ser tomados en cuenta cuando se desea producir tanto algún metabolito como al propio microorganismo (biomasa) con algún fin práctico.

En la producción de los mismos se debe encontrar, en primera instancia, una fuente segura en términos toxicológicos y de niveles de producción, así como garantizar el mecanismo de preservación de las características a explotar. Las condiciones de

almacenamiento varían de grupo a grupo. El siguiente problema será encontrar el punto de equilibrio entre las condiciones que garantizan la mejor expresión de las características deseadas con aquellas que permiten la mejor conservación del microorganismo. A continuación debe establecerse cuál es el patrón de variación natural, tanto del microorganismo como de la producción del metabolito deseado. Esto puede tener repercusiones importantes en la evaluación de las técnicas de cuantificación de rendimientos como en las de establecimiento de condiciones de conservación. Si el comportamiento de la población es muy variable pueden, inclusive, presentarse dudas sobre la identidad del microorganismo. Finalmente, puede iniciarse un programa de mejoramiento nutricional y genético para el proceso.

Los programas de manipulación genética pueden incluir técnicas genéticas clásicas, como la mutagénesis química, física y biológica, así como los fenómenos de transferencia de genes denominados transformación, transducción y conjugación, los cuales se realizan sólo en ciertas cepas que poseen la "maquinaria" necesaria para llevarlos a cabo o, en su caso, son sensibles al ataque por fagos. En eucariotos inferiores pueden ocurrir fenómenos de recombinación en los ciclos sexual y parasexual. Todos los organismos presentan barreras naturales a la transferencia de genes. Para vencer algunas de ellas se han desarrollado técnicas como la formación y fusión de protoplastos, la biobalística y la electroporación, además de las técnicas de clonación molecular. En la última década se ha diversificado considerablemente el número de organismos que pueden servir como hospederos de genes heterólogos. Los sistemas recombinantes presentan, en general, fuertes problemas para mantener la información introducida y lograr la sobreproducción o expresión de la misma y sobre todo, para lograr transmitir a la descendencia las características de interés.

A pesar de que se venzan las barreras para la transferencia y expresión de genes heterólogos y de que las mutaciones resulten eficaces, las propiedades adquiridas durante un programa de mejoramiento genético pueden perderse si no aportan al microorganismo alguna ventaja adaptativa. El problema principal del microbiólogo industrial radica en que tiene que luchar contra una propiedad inherente a los seres vivos, como lo es la plasticidad genómica, en aras de la hiperproducción estable de metabolitos que resultan importantes para el investigador y dudosamente, para el propio microorganismo en las condiciones de cultivo de un laboratorio o un fermentador (1). Un fenómeno como el ilustrado en la figura 1 es relativamente común en estos casos. La capacidad de producir un metabolito se pierde tras un número relativamente bajo de resiembras. Esto constituye un gran problema, con repercusiones importantes en programas de producción y en consecuencia, en la economía de los procesos.

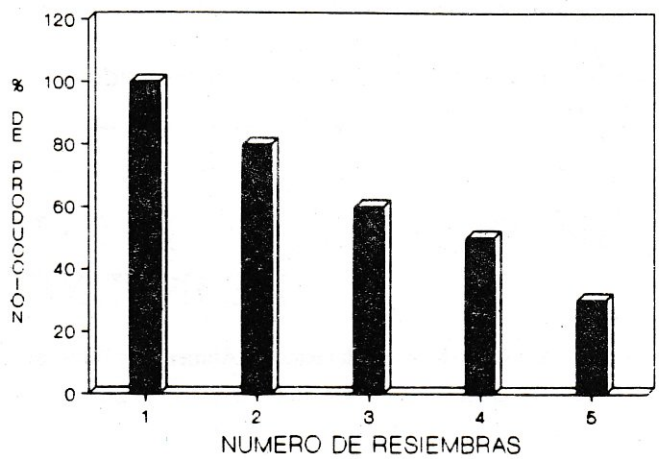

Figura 1. Disminución en la capacidad de producción de un metabolito determinado tras resiembras sucesivas.

Por lo tanto, es importante saber por qué se presentan estos cambios en los niveles de producción y analizar los mecanismos genéticos y fisiológicos que los provocan y así encontrar posibles soluciones.

2. MECANISMOS DE GENERACION DE CAMBIOS EN LA INFORMACION GENETICA

Los cambios en el mensaje genético pueden generarse por diversos agentes. No sólo ocurren mutaciones o cambios provocados intencionalmente, sino que se pueden presentar cambios debidos a mutágenos ambientales, entre los que se cuentan la luz ultravioleta, las radiaciones

los cambios bruscos de temperatura, entre los agentes físicos; ciertos productos químicos como ácido nitroso, etilmetano sulfonato e hidroximetilamina y finalmente, agentes biológicos como los virus y los transposones.

Aparentemente, las mutaciones espontáneas, se producen con cierta frecuencia, alrededor de una en un millón de nucleótidos. La misma está determinada por factores como la eficiencia de los sistemas de edición de la ADN polimerasa durante la duplicación del genoma, la eficacia de los sistemas de reparación que se inducen ante la detección de cambios en el material genético, la presencia de factores como pigmentos que protegen contra radiaciones luminosas, por ejemplo, o de mecanismos que inactiven al agente mutagénico, como endonucleasas de restricción ante virus y transposones. Dadas las diferencias entre los diversos organismos en cuanto a estos mecanismos, el microbiólogo industrial, si desea inducir mutaciones, hace uso de agentes y condiciones específicos para cada grupo o toma las precauciones necesarias al diseñar mecanismos de conservación de los organismos. Los daños, inducidos o espontáneos, se notan rápidamente en las poblaciones con ciclo de vida corto, en las que el número de duplicaciones en el tiempo permite acumular cambios notables en una población. No obstante, el manejo de los cultivos es fundamental, ya que la presencia de pequeñas cantidades de células no mutadas, abolirá el efecto de la mutación si esta última no trae consigo una clara ventaja adaptativa, ya que la mayor parte de los modelos establecidos predicen el crecimiento superior de las cepas silvestres sobre las mutantes (2).

La recombinación es el mecanismo de producción de alteraciones en la información por el que se generan la mayor cantidad de cambios evolutivos. Los procesos ya mencionados de transferencia de genes así como el entrecruzamiento de cromosomas que se lleva a cabo durante la meiosis en la reproducción sexual y en ocasiones, durante la mitosis, requieren de un mecanismo enzimático para permitir la combinación de las cadenas cromosómicas de diferente origen.

El intercambio de material genético tiene lugar al coincidir dos cadenas de ácidos nucleicos diferentes. Cuando entre dichas cadenas existe un mínimo de homología, se puede hablar de recombinación genética legítima, cuando ésta no existe, se denomina recombinación ilegítima. El mecanismo de recombinación se puede dar entre plásmidos y cromosomas tal y como ocurre con el proceso de conjugación, también se da entre los fagos y los cromosomas en el fenómeno de transducción e igualmente puede ocurrir entre elementos genéticos diversos como es el caso de la transformación y de la fusión celular. En el genoma de muchos organismos se encuentran secuencias móviles denominadas secuencias de inserción (IS), las cuales se caracterizan por su amplia distribución y porque permiten la ocurrencia de fenómenos como la transposición, la inserción y la deleción. Algunas de estas secuencias se ilustran en la Tabla I.

TABLA I

EJEMPLOS DE SECUENCIAS MOVILES

NOMBRE	TAMAÑO (pb)	ZONA HOMOLOGA BLANCO (pb)	CODIFICA	REPETICION TERMINAL (pb)
IS1	768	9	-	30, invertida
IS3	1400	3-4	-	32, invertida
Tn9	2600	9	resistencia a cloranfenicol	768, (IS1) directa
Tn5	5700	9	resistencia a kanamicina	1400, invertida

Las interacciones mencionadas permiten la adquisición de nuevas características por parte de la cepa receptora. Se pueden presentar también rearreglos genéticos, como inversiones, deleciones y duplicaciones, con resultados positivos o negativos para la producción del metabolito de interés de acuerdo a la zona en la que se hayan efectuado.

En contraste con los mecanismos señalados líneas arriba, que se traducen en fenómenos que contribuyen a la diversificación del genoma y que se pueden considerar como fuentes de inestabilidad del mismo, existen mecanismos que limitan e impiden la movilización de genes; entre estas barreras encontramos:

- Estructura de la pared celular. Las principales diferencias se deben a glucoproteínas, éstas constituyen los denominados tipos de apareamiento en hongos y permiten el contacto de las superficies celulares durante el proceso de la conjugación en otros grupos. Factores de superficie determinan también el intervalo de hospederos de los diversos fagos.

- Competencia. Se denomina competencia a la capacidad celular para aceptar un ADN extraño, muy pocos microorganismos como *Bacillus subtilis* y *Haemophilus influenzae* pueden realizarla en condiciones naturales. Otros como *E. coli*, requieren de ser colocados en condiciones específicas, tales como en una solución de cloruro de calcio de baja molaridad y en frío. Las levaduras aceptan el ADN en presencia de iones como litio. En todos los casos la presencia de agentes como el polietilenglicol facilita el proceso de introducción de ácidos nucleicos.

- Sistemas de restricción y modificación de ácidos nucleicos. Casi todas las especies poseen enzimas de restricción que les permiten degradar los ácidos nucleicos heterólogos, a quienes reconocen por carecer de las alteraciones estructurales introducidas por los sistemas de modificación. Sin embargo, no todos los tipos de enzimas de restricción están asociados a estos sistemas.

- Incompatibilidad mitótica. En organismos eucariotos es importante el proceso de segregación mediante el que las células hijas adquieren exactamente el número de cromosomas de la célula madre. Además, durante la meiosis se lleva a cabo la recombinación entre cromosomas homólogos. Si acaso existen diferencias considerables en el número cromosómico de dos especies a las que se pretende fusionar, los cromosomas pueden presentar problemas de segregación y tender a perderse en forma desordenada.

3. EL CONCEPTO DE ESTABILIDAD GENETICA Y SU REPERCUSION EN LA TAXONOMIA.

Tradicionalmente los microorganismos se han clasificado y agrupado en categorías taxonómicas de acuerdo a su morfología, su comportamiento ante ciertos sustratos bioquímicos como reflejo de su metabolismo y la presencia de estructuras reproductivas características. Estos criterios presentan ciertos problemas de aplicación ya que aún en una población aparentemente homogénea es posible encontrar variantes y más aún entre las diferentes etapas del ciclo de vida de un microorganismo. Las técnicas de biología molecular permiten ahora emplear criterios más certeros al hacer uso de comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos y patrones de restricción (3). Lamentablemente por su complejidad y alto costo, estas técnicas no están disponibles para todos los laboratorios de microbiología. Una técnica posiblemente más asequible sea la comparación de ciertos marcadores bioquímicos (4).

En cualquier caso, se deben establecer límites a la variación aceptable para considerar a los diferentes individuos miembros de una población o a poblaciones como integrantes de la especie. Es importante emplear la mayor variedad posible de criterios taxonómicos para garantizar la adecuada clasificación de las variantes y emplear los métodos de conservación adecuados para disminuir la variabilidad.

4. ELEMENTOS EXTRACROMOSOMALES Y RECOMBINACION *IN VITRO*

En ciertos grupos de microorganismos usados en

la industria, se ha observado la pérdida espontánea de la capacidad de elaboración de metabolitos de interés. Así, se ha reportado la pérdida de la capacidad de metabolizar lactosa en bacterias lácticas (5) o de formar esporas, micelio aéreo y antibióticos en actinomicetos (6). Las frecuencias observadas de pérdida son de 1/100 o de 1/1,000.

Las explicaciones encontradas en ambos casos son diferentes. En el caso de las bacterias lácticas la desaparición de algunas de las características de interés se atribuye a la desaparición de sus plásmidos. Las pruebas al respecto incluyen el cuantificar la producción del metabolito tras varias resiembras y en paralelo, observar la presencia o ausencia de plásmidos en geles de electroforesis. También se han mapeado estas características por procesos de conjugación o por "curación" de los plásmidos con agentes intercalantes, como el bromuro de etidio y la consiguiente pérdida de la característica. En el caso de actinomicetos se ha visto que las secuencias que se pierden fácilmente se encuentran repetidas (7). La presencia de secuencias homólogas tiene como consecuencia el incremento de la probabilidad de que ocurra un fenómeno de recombinación legítima y a la vez, la probabilidad de un rearreglo cromosómico.

Los dos fenómenos, sin embargo, permiten explicar por que son inestables los plásmidos, tanto los naturales como los construidos por recombinación *in vitro*. En los dos casos se presenta inestabilidad, que puede ser segregacional o estructural.

La inestabilidad estructural se presenta cuando ocurre recombinación intramolecular al existir zonas de mayor o menor homología, lo que es más probable cuando existen repeticiones en los genes. Tras el proceso de recombinación puede haberse perdido la región que codifica para el gen de interés o quedar colocada de forma que su expresión sea imposible. La inestabilidad estructural se puede detectar, tras varias resiembras, por la pérdida espontánea de una característica fenotípica determinada o en un cultivo contínuo (Fig. 2). Si se detecta la presencia de plásmidos en la población y se recurre al análisis de los patrones de restricción de los mismos, se pueden notar alteraciones. Una

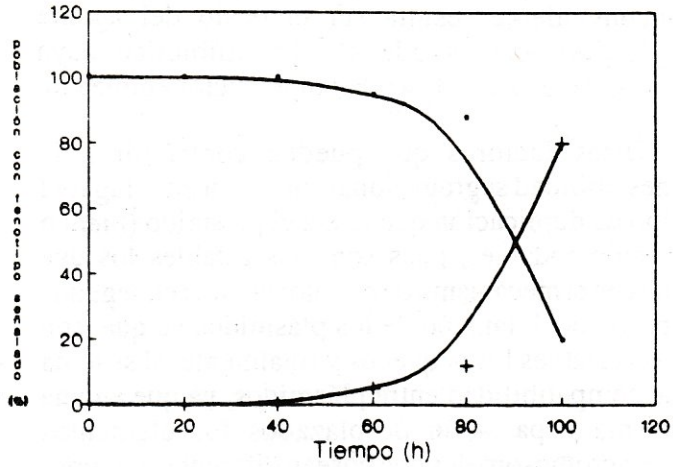

Figura 2. Desaparición de células con fenotipo amilolítico (-) y aparición, al paso del tiempo, de células no poseedoras de dicha actividad (+) , en condiciones de presión selectiva (presencia de antibióticos codificados por el plásmido).

estrategia para resolver el problema es emplear como hospederos cepas deficientes en sistemas de recombinación, *rec*A o equivalentes, para minimizar la posibilidad de que se lleve a cabo el fenómeno. Se ha reportado que la presencia de esta mutación disminuye al menos cien veces la posibilidad de pérdida de la información.

La inestabilidad segregacional se debe a la pérdida de plásmidos que contienen la información de interés, en una fracción de la población originalmente poseedora. Esto se debe a la falta de sincronía entre la duplicación cromosomal de los plásmidos y la formación del septo entre las células hijas. Entre los genes responsables de este proceso se encuentran *par* y *stb* en bacterias Gram negativas. El mal funcionamiento o la ausencia de los mismos, trae como consecuencia una distribución aleatoria de plásmidos en la población. Las células que carecen de plásmidos tenderán a predominar sobre las poseedoras de los mismos, debido al requerimiento energético para mantenimiento y duplicación. Para evitar este dominio se puede recurrir a varias estrategias, entre ellas a la adición de sustancias que ejerzan presión selectiva que favorezca el crecimiento de las células poseedoras del elemento extracromosomal. Esta estrategia ha sido empleada con éxito en sistemas de producción de organismos recombinantes y el único

inconveniente resulta ser el costo del agente selectivo. Este puede ser un antibiótico cuya resistencia sea codificada por el vector empleado.

Otros factores que pueden contribuir a la inestabilidad segregacional son, en primer lugar el tipo de duplicación que tenga el plásmido (*theta* o círculo rodante), pues son más estables los que poseen el mecanismo de círculo rodante; en segunda instancia el tamaño de los plásmidos ya que son más estables los pequeños y finalmente, el sistema de compatibilidad entre plásmidos, ya que en una misma cepa serán desplazados los elementos extracromosomales que posean diferentes sistemas de compatibilidad. Algunas estrategias adicionales de control de la segregación incluyen el manejo adecuado de las condiciones de cultivo, ya que los plásmidos tenderán a perderse si el crecimiento es rápido o bien la introducción de "genes suicidas" como *hok*, proteína que mata a las células que pierden los plásmidos por mecanismos poco conocidos (8).

Los sistemas de clonación molecular pueden contribuir a estabilizar características. Por ejemplo, los trabajos del grupo de Chopin (9) con bacterias lácticas han permitido la estabilización de genes normalmente codificados en plásmidos al introducirlos al cromosoma. Si esto se hace porque se logra colocar varias copias, una tras otra, la garantía de estabilización es mayor.

CONCLUSIONES

Todo microbiólogo persigue realizar su trabajo con cepas estables, cuya identificación sea clara y su variabilidad mínima. Sin embargo, resulta paradójico el que sean necesarios mecanismos de transmisión genética estable para garantizar la preservación de la especie, aun y cuando se requiere de la plasticidad, con la consecuente inestabilidad, para que la evolución biológica se lleve a cabo y el organismo pueda adaptarse a nuevas condiciones ambientales.

La estabilidad de una característica se logrará en cierta manera, si en el establecimiento de las condiciones de almacenamiento y manipulación, se logra establecer un balance entre las necesidades de adaptación a las condiciones ambientales y las de producción del metabolito de interés.

BIBLIOGRAFIA

1. Arber, W. (1990). Limits to genetic stability: relevance for microbial evolution. En: Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Editores: Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L., Durand, G. y Penasse, L. Societé Francaise du Microbiologie, Paris. pp 37-48.

2. DeWitt, J., Jackson, J. y Paulus, T. (1989). Actinomycetes. En Fermentation process development of industrial microorganisms, Editor: Neway, J.O., Marcel Dekker, New York. pp. 1-72.

3. Mullaney, E.J. y Kich, M.A. (1990). A review of molecular techniques for systematic studies of *Aspergillus* and *Penicillium*. En: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Editores: Samson, R. y Pitt, J. Plenum Press, New York; pp. 301-308.

4. Wagner, F., Gay, G. y Debaud, C. (1988). Genetical variability of glutamate dehydrogenase activity in monokaryotic and dikaryotic mycelia of the ectinycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. *28*: 566-571.

5. Berg, D. (1990). Genomic rearrangements in prokaryotes. En: Gene rearrangement, Editores: Hames, D. y Glover, D. IRL Press, Oxford. pp. 1-43.

6. McKay, L. (1978). Microorganisms and their instability in milk and milk products. Food Technol. *32*: 181-185.

7. Schrempf, H. (1990). Genetic instability in *Streptomyces*. En. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Editores: Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L., Durand, G. y Penasse, L. Societé Francaise de Microbiologie, Paris. pp. 61-72.

8. Wood, T.K., Kuhn, R.H. y Peretti, S.W. (1990). Enhanced plasmid stability through post-segregational killing of plasmid free cells. Biothechnol. Tech. *4*: 39-44.

9. Chopin, M.C., Chopin,A., Roualt, A. y Galleron, N. (1989). Insertion and amplification of foreign genes in the *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* chromosome. Appl. Environ. Microbiol. *55*: 1769-1774.

EL PAPEL DEL COLESTEROL EN LOS PROCESOS TUMORALES

Federico Martínez, Oscar Flores Herrera, Juan Pablo Pardo, Guillermo Mendoza Hernández y Ma. Teresa Espinosa García. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-159, C.P. 04510, D.F., México.

RESUMEN

Los procesos tumorales se conocen desde hace muchos años, y sus manifestaciones clínicas son variadas. Desde el punto de vista médico y científico el cáncer ha despertado el interés de varios investigadores que han buscado las causas que lo originan. Actualmente hay varias hipótesis sobre el origen de los procesos tumorales, que van desde las infecciones virales, hasta problemas irritativos crónicos producidos por contaminantes o ciertos agentes químicos.

En esta revisión se discutirán algunos de los hallazgos relacionados con la alteración en el metabolismo del colesterol y su repercusión en el metabolismo celular asociado con los procesos tumorales. Asímismo, se analizarán los cambios mitocondriales producidos durante el proceso tumoral y finalmente se describirán algunas de las características funcionales de las mitocondrias de estos tejidos.

Palabras Clave: Cáncer, mitocondria, hepatoma, colesterol, respiración.

PAPEL DEL COLESTEROL EN LAS MEMBRANAS BIOLOGICAS

El papel del colesterol en la biología, particularmente en la biología humana, está bien caracterizado (1). Los mamíferos requieren del colesterol para realizar las funciones celulares normales. Los requerimientos diarios de colesterol se satisfacen tanto por su ingesta en la dieta, como por la síntesis *de novo* que se realiza en el organismo. Aunque el colesterol es esencial para el crecimiento celular, en un momento determinado puede ser fatal para el organismo. En la población humana, la arterioesclerosis y los daños coronarios son de los padecimientos que ocupan uno de los primeros lugares en el mundo. Esto sugiere que cualquier modificación en la composición de los lípidos en el organismo puede traer consigo efectos adversos a la célula o al mismo organismo.

Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual ciertas membranas contienen una mayor cantidad de colesterol que otras; sin embargo, se han propuesto varios mecanismos, como la desabsorción del colesterol de una membrana hacia la fase acuosa y de ahí a otra membrana con menor contenido de colesterol. Otro mecanismo es la transferencia de colesterol por contacto entre membranas; también se ha propuesto que la presencia de fosfatidilcolina y/o esfingomielina en la membrana determina cual será la concentración de colesterol en ésta, ya que estos lípidos tienen una gran capacidad para asociarse al colesterol; otro mecanismo propuesto es a través de proteínas acarreadoras específicas, que bajo ciertas señales remueven y depositan colesterol; finalmente, se ha propuesto un mecanismo de tranferencia membranal por vesiculación, en donde una membrana proporciona, junto con fosfolípidos y proteínas, colesterol. Todas estas teorías siguen en estudio y es probable que en breve se tenga un conocimiento seguro del mecanismo de transporte de colesterol en las membranas y se determine el o los factores que le permiten a la célula mantener una concentración particular en cada orgánulo (2).

Independientemente del mecanismo que la célula emplee para regular la cantidad de colesterol en sus

membranas, se conoce con certeza que el aumento de esteroles en las membranas artificiales incrementa la eficiencia de empacamiento de los fosfolípidos, produciendo una disminución en la movilidad de los acilos que los constituyen (3) y confiriéndole mayor rigidez.

Aunque la distribución local del colesterol en las membranas es poco conocida, de manera general se acepta que la membrana contiene dominios o regiones especializadas en las que la concentración de colesterol difiere en relación a otras áreas de la misma membrana. Sin embargo, el factor más importante que se ha propuesto como regulador de la distribución del colesterol en la membrana es la cantidad del mismo en relación a la cantidad de fosfolípidos en cada orgánulo o compartimiento, lo que se denomina la relación colesterol/fosfolípido (C/FL). Esta relación puede ser modificada por varios métodos, como es la dieta (4), incubación de las células u orgánulos con complejos de colesterol (3) o bien por alteraciones en los mecanismos internos de regulación en la síntesis *de novo* del colesterol.

En relación a este último punto, se ha propuesto que la 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA reductasa es la principal enzima reguladora en la síntesis de colesterol, aunque no es la única. Su principal modulador es la concentración de colesterol que regula su síntesis y degradación, ya que tiene un tiempo de vida relativamente corta (2 a 3 horas), de tal manera que cambios en su velocidad de síntesis afectan la concentración real de la enzima. Otra vía de regulación es por fosforilación/ desfosforilación mediada por una cascada de proteíncinasas que inactivan a la enzima y una fosfoproteína fosfatasa que la reactiva. También se ha propuesto que algunos metabolitos de la síntesis del colesterol podrían tener un efecto regulador, como la ubiquinona, isopentenil adenina y el 25 - hidroxicolesterol (5 y 6) entre otros.

En algunas células tumorales se pierde el control de la síntesis *de novo* del colesterol, un fenómeno bien establecido en hepatomas. La pérdida de este control se puede observar aún antes de que aparezca cualquier manifestación de la presencia del tumor. La pérdida del control induce a una acumulación del colesterol en las membranas celulares alterando la relación C/FL y posteriormente modificando la función membranal que puede promover la tumorogénesis. Por otro lado, se ha observado que algunos intermediarios de la colesterogénesis, subsecuentes a la formacion del ácido mevalónico, pero antes de la formación de escualeno, actúan como disparadores de la duplicación del DNA antes de la mitosis, a través de un mecanismo que aún se desconoce, lo que termina en un estímulo constante de la proliferación celular.

El incremento de colesterol en las membranas altera su permeabilidad y la capacidad de transporte, ya que en el enriquecimiento de colesterol en eritrocitos, reduce la permeabilidad pasiva y facilita la difusión de electrolitos y no electrolitos, mientras que por el contrario, la eliminación del colesterol membranal incrementa la permeabilidad al glicerol, acetato y sodio. Estos efectos podrían estar asociados también a cambios en la actividad de algunas enzimas membranales, ya que se ha observado que el enriquecimiento con colesterol en la membrana afecta a la acetil colinesterasa, a la Na/K-ATPasa, mientras que no se afecta la actividad de la Mg-ATPasa. Estos resultados demuestran que la alteración de la relación C/FL modifica algunas funciones membranales.

ALTERACIONES LIPIDICAS EN MITOCONDRIAS DE TEJIDOS TUMORALES

Se ha observado que la falta de regulación de la síntesis de colesterol incrementa su concentración en la célula, elevando también su contenido en las mitocondrias (Tabla I). En las mitocondrias de hígado de rata, la concentración de colesterol varía entre 3 a 5 μg por mg de proteína, mientras que en mitocondrias aisladas de hepatomas, su concentración está entre 13 a 40 μg por mg de proteína, lo que lleva a una modificación importante de la relación C/FL (3, 5 y 7). Es importante hacer notar que otros lípidos también pueden cambiar su concentración en la membrana (8) y aunque se ha estudiado el efecto que producen estos cambios, la presencia de colesterol parece ser el factor más importante que modifica algunas funciones mitocondriales.

TABLA I

CONCENTRACION DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS EN MITOCONDRIAS CONTROL Y EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE DIVERSOS TUMORES.

	COLESTEROL µg/mg	FOSFOLIPIDOS µg/mg	RELACION C/FL
Mitocondrias control	4.6 ±1.4	0.148 ±0.000	1:17.9
Mitocondrias hepáticas de tejidos tumorales			
Yoshida	17.7 ±1.2	0.190 ±0.000	1: 6.1
Mitocondrias control	4.9 ±0.9		
Mitocondrias hepáticas de tejidos tumorales			
3924A	25.7 ±6.7		
Mitocondrias control	5.2 ±1.5	0.158 ±0.012	1:16.8
de hígado fetal	5.1 ±1.1	0.130 ±0.022	1:14.1
enriquecida con colesterol	19.2 ±0.6	0.182 ±0.008	1: 5.2
Mitocondrias hepáticas de tejidos tumorales			
AH-130	22.6 ±2.4	0.168 ±0.026	1: 4.1
3924A	20.2 ±4.2	0.134 ±0.008	1: 3.7
5123	32.4 ±6.7	0.124 ±0.035	1: 2.1
Mitocondrias control	4.9 ±0.9		
Mitocondrias hepáticas de tejidos tumorales			
3924A	25.7 ±6.7		
16	13.7 ±m4.1		

ALTERACIONES FUNCIONALES DE LAS MITOCONDRIAS DE TEJIDOS TUMORALES

Una de las primeras alteraciones que se observan en las mitocondrias aisladas de hepatomas, es la baja capacidad del consumo de oxígeno (5, 7). La disminución de la respiración se ha asociado a los cambios de fluidez que le puede conferir el exceso de colesterol (Tabla II), ya que el enriquecimiento artificial de mitocondrias aisladas de hígado normal con colesterol, demostró una velocidad de respiración similar a la observada en las mitocondrias de hepatomas (3). Por otro lado, se ha demostrado que el colesterol inhibe a la ATPasa aislada *in vitro* y recientemente en nuestro laboratorio hemos descrito que el incremento de colesterol en mitocondrias de hígado de rata produce una ligera inhibición de esta enzima (9).

TABLA II

VELOCIDAD DEL CONSUMO DE OXIGENO EN MITOCONDRIAS NORMALES Y OBTENIDAS DE TUMORES

	ESTADO 3	ESTADO 4
	natomos de oxígeno/mg/min	
Mitocondrias Control	72.0 ± 11.0	7.3 ± 1.3
de hígado fetal	26.8 ± 7.7	5.3 ± 0.8
enriquecidas con colesterol	63.6 ± 3.3	5.9 ± 0.6
Mitocondrias de tejidos tumorales hepáticos		
AH-130	64.4 ± 2.8	7.0 ± 3.1
3924A	24.9 ± 5.6	4.3 ± 0.9
5123	23.4 ± 6.2	4.4 ± 1.7

Estos resultados se obtuvieron con glutamato-malato como sustratos oxidables.

Mitocondrias control	38.8 ± 5.1
Mitocondrias de tejidos tumorales hepáticos	
3924A	No detectable
16	14.4 ± 1.3

Estos resultados se obtuvieron con piruvato-malato como sustratos oxidables.

Se ha demostrado que en estas mitocondrias de células tumorales, los desacoplantes no estimulan la actividad de la ATPasa como sucede en mitocondrias normales. Estos efectos se han explicado como resultado del incremento en la salida del citrato intramitocondrial, ya que el citoplasma proporciona acetil-CoA que es necesaria para mantener la elevada síntesis citoplasmática del colesterol (Fig. 1). Cuando las mitocondrias de hepatoma son cargadas con citrato, por un lado no lo retienen y por otro muestran una tasa elevada de su salida hacia el citosol, lo que provoca una disminución de la actividad del ciclo de Krebs y como consecuencia una falta de reducción de los piridín nucleótidos, básicamente del NADH, que no permite alimentar a la cadena respiratoria de manera normal (Fig. 1).

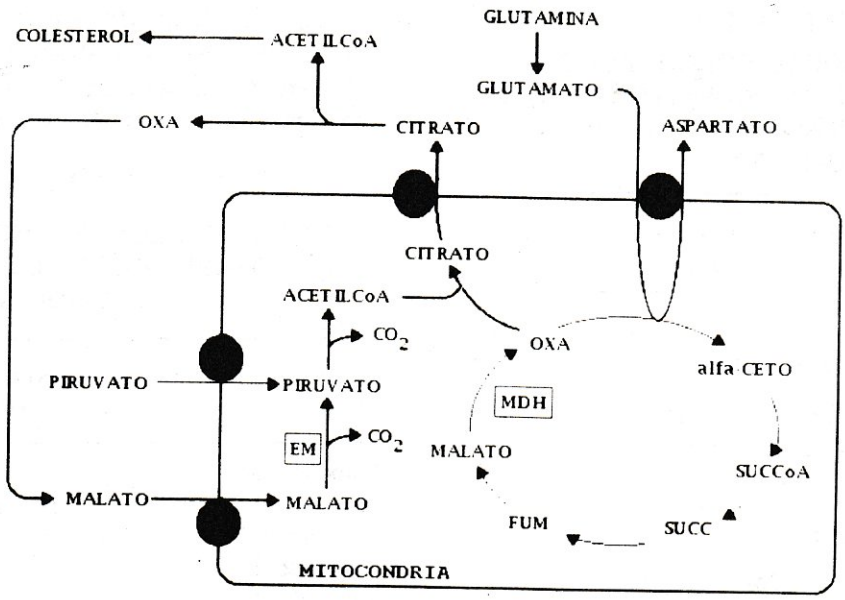

Figura 1. Mecanismo propuesto para el metabolismo mitocondrial de tejidos tumorales. Las líneas gruesas indican la ruta metabólica que predomina en el metabolismo mitocondrial en hepatomas. MDH = malato deshidrogenasa, EM = enzima málica, alfa-CETO = alfa cetoglutarato, SUCCoA = succinil-coenzima A SUCC = succinato FUM = fumarato OXA=oxaloacetato ACETILCoA = acetil-coenzima A.

Por otro lado, se ha observado que la respiración en presencia de glutamato no está disminuída, de hecho se ha sugerido que el principal sustrato empleado por las células tumorales es el glutamato o la glutamina, y se ha asociado la actividad de la glutaminasa mitocondrial con la velocidad de crecimiento del tumor y su malignidad. La degradación del ácido glutámico se ha asociado con la presencia característica de la enzima málica intramitocondrial. Un hallazgo particularmente importante es que esta enzima es una de las pocas que aumentan en la medida que el proceso tumoral avanza. La razón por la cual se asocia la oxidación del glutamato con la enzima málica, es que el glutamato durante su oxidación, proporciona oxaloacetato, el cual no se puede utilizar en el ciclo de Krebs, puesto que no hay acetil CoA para formar citrato; mientras que la presencia de la enzima málica, permite obtener piruvato, que se descarboxila produciendo acetil CoA (Fig. 1). El oxalacetato que proviene del glutamato y la acetil CoA que proviene del malato, sintetizan citrato a través de la citrato sintetasa. Sin embargo, como se mencionó antes, el citrato así formado sale de la mitocondria para mantener el proceso de síntesis de colesterol elevado.

También se ha descrito en las mitocondias de tumores una disminución en el transporte de los adenín nucleótidos, con un Km de 6μM y una Vmax de aproximadamente 1.6 nmol/mg/min en comparación a una Km de 2.5 μM hacia los mismos y una Vmax de 8 nmol/mg/min de las mitocondrias control. Estos resultados también se han utilizado para explicar la baja respuesta a los desacoplantes y la causa posible de la baja tasa de respiración.

Otros parámetros que se modifican en las mitocondrias de tejidos tumorales es el transporte de calcio y magnesio. Se demostró que estas mitocondrias son capaces de retener más calcio que las mitocondrias normales, mientras que no son capaces de retener al magnesio. El efecto combinado de estos dos resultados podria unirse al motivo del por que estas mitocondrias muestran un consumo bajo de oxígeno.

Una observación interesante es que el enriquecimiento de las mitocondrias con colesterol las hace más resistentes a los daños físicos externos. Se ha demostrado que la incorporacion de colesterol en mitocondrias normales permite mantener sus características respiratorias sin cambios importantes cuando menos por 16 horas. También se ha demostrado una mayor resistencia al hinchamiento por cambios osmóticos en las mitocondrias enriquecidas con colesterol, mientras que se observaron cambios significativos en las

mitocondrias normales, sugiriendo que las mitocondrias con elevado contenido de colesterol son más resistentes a los daños físicos. De igual manera, se ha determinado que los tejidos como el corazón, que dependen de manera importante de la presencia de oxígeno, durante periodos de isquemia incrementan la concentración de colesterol en las membranas mitocondriales modificando la relación C/FL (10), aunque también se ha propuesto que el incremento en esta relación se debe a un aumento en la degradación de fosfolípidos.

Independientemente del mecanismo que utilice el tejido isquémico, el resultado es que la relación C/FL aumenta y como consecuencia debe modificar algunas de las funciones que realiza la mitocondria; en este caso proponemos que la rigidez membranal disminuye de manera importante los requerimientos de oxígeno y le permite a la mitocondria adaptarse para resistir el daño membranal. Por otro lado, las mitocondrias de tejidos no tumorales, como son las de placenta humana, muestran un elevado contenido de colesterol (30 μg/mg de proteína). Se ha reportado que los implantes de este órgano son capaces de soportar cambios bruscos de osmolaridad, de temperatura y presión. Por otro lado, también se ha observado que las mitocondrias de la placenta humana muestran, en algunos aspectos, un comportamiento similar a las mitocondrias de tejidos tumorales.

Podemos resumir que el colesterol afecta la función de las mitocondrias porque: 1) influye en su estabilidad y en su comportamiento osmótico, 2) modifica la actividad respiratoria y su producción de energía, 3) altera la permeabilidad y el transporte a través de la membrana, 4) afecta la estructura membranal y la interacción proteína-lípido; finalmente, 5) modula la actividad de algunas enzimas mitocondriales *in vivo* e *in vitro*. Aún faltan preguntas por contestar, sin embargo el cancer nos muestra el valor que tiene la compleja organización celular y del organismo para mantener el control metabólico de un tejido en particular.

Finalmente, la revisión muestra una relación positiva entre la fluidez de la membrana y los procesos tumorales y se puede sugerir que las alteraciones en la fluidez membranal, las cuales se acompañan de transformación tumoral, son un factor esencial en el proceso carcinogénico y aunque la ciencia avanza, queda mucho por conocer de los mecanismos que mantienen una adecuada fluidez membranal en las células.

REFERENCIAS

1. Spector, A.A. y Yorek, M.A. (1985) Membrane lipid composition and cellular function. J. Lipid Res. *26*: 1015-1035.

2. Cooper, R.A y Strauss, J.F III (1984) En: Physiology of membrane fluidity. Vol. I, Editor: M. Shinitzky. CRC Press, Inc. Florida, USA, pp. 73-97.

3. Martínez, F., Echegoyen, S., Briones, R. y Cuéllar, A. (1988) Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. J. Lipid Res. *29*: 1005-1011.

4. Feo, F., Canuto, R.A., Garcea, R. y Gabriel, L. (1975) Effect of cholesterol content on some physical and functional properties of mitochondria isolated from adult rat liver, fetal liver, cholesterol'enriched liver and hepatomas AH-130, 3924A and 5123. Biochim. Biophys. Acta *413*: 116-134.

5. Coleman, P.S. y Parlo, R.A. (1984) Cholesterol-rich tumor mitochondria encourage altered metabolic patterns and cell proliferation. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA *435:* 129-132.

6. Carafoli, E. (1986) Mitochondrial pathology: an overview. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA *488*: 1-18.

7. Brossa, O., Garcea, R., Canuto, R.A., Gautero, B. y Feo, F. (1980) Cholesterol and phospholipid contents of the inner and outer membranes of highly purified mitochondria from the Yoshida hepatoma AH-130. IRCS Medical Sci. *8*: 73-74.

8. Morton, R., Cunningham, C., Richard, J., Waite, M., Miller, N. y Morris, H.P. (1976) Alteration of mitochondrial function and lipid composition in Morris 7777 hepatoma. Cancer Res. *36*: 3246-3254.

9. Echegoyen, S., Oliva, M.E., Sepúlveda, J., Díaz-Zagoya, J.C., Espinosa-García, M.T., Pardo, J.P. y Martínez, F. (1993) Cholesterol increase in mitochondria. Its effect on inner membrane functions, submitochondrial localization, and ultrastructural morphology. Biochem. J. *289*: 703-708.

10. Rouselin, W., MacGee, J., Gupte, S., Wesselman, A. y Epps, D.E. (1982) Mitochondrial cholesterol content and membrane properties in porcine myocardial ischemia. Am. J. Physiol. *242*:H254-H259.

PAPEL DE LA ACTIVIDAD NEURONAL EN LA DIFERENCIACION CELULAR

Julio Morán. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, D.F.

RESUMEN

Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso (SN) las neuronas migran y pasan a través de numerosos cambios morfológicos y fisiológicos que llevan al establecimiento de la compleja organizacion estructural y funcional del cerebro. En las células gliales, que tienen un papel fundamental en el funcionamiento del SN maduro, también ocurren alteraciones asociadas al desarrollo. Se sabe que todos estos cambios plásticos están gobernados por una multitud de factores que incluyen a una gran variedad de agentes tróficos. Recientemente se ha propuesto que dentro de estos agentes podría contemplarse a ciertos neurotransmisores clásicos. Tal es el caso del glutamato, que además ejerce una fuerte acción tóxica en el SN maduro. Otros neurotransmisores como la norepinefrina, la serotonina y el GABA, también podrían participar como agentes neurotróficos sobre las células gliales y neuronales en el modelado del sistema nervioso.

Palabras claves: cultivo neuronal, efecto trófico, neurotransmisores, desarrollo neural.

INTRODUCCION

El sistema nervioso central es una estructura muy compleja con un alto grado de organización funcional y estructural. Esta organización es el resultado, en gran parte, de una serie de fenómenos regulados finamente durante el desarrollo y llevados a cabo de una forma coordinada en el tiempo y el espacio. Los procesos del desarrollo neuronal incluyen la migración de las células a su destino final, el crecimiento de las axones hacia sus blancos sinápticos, la formación y modificación de los circuitos y la citoarquitectura neuronales, la muerte neuronal como proceso programado y la expresión del fenotipo neuronal. Es sabido desde el descubrimiento del Factor de Crecimiento Neuronal que estos procesos se encuentran controlados por factores tróficos que incluyen al Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro, el Factor Neurotrófico Ciliar, la Neurotrofina-3, etc. Existen evidencias que sugieren que puede haber además otras moléculas responsables del mantenimiento y diferenciación de las células neuronales y gliales durante el desarrollo que incluyen proteínas, péptidos y otras sustancias endógenas liberadas a la sinapsis o activadas como resultado de los fenómenos sinápticos. Recientemente se han incorporado a esta lista otras moléculas consideradas por tradición como mensajeros intercelulares en el sistema nervioso: los neurotransmisores. En este trabajo se revisará en forma breve el papel trófico de los neurotransmisores durante el desarrollo.

SOBREVIVENCIA NEURONAL

Durante el desarrollo del sistema nervioso ocurre una muerte masiva de neuronas antes de haber completado la diferenciación celular. Esto no representa un fenómeno patológico, sino una característica normal de la neurogénesis y aunque no se conoce bien su función biológica, se cree que es una consecuencia de la sobreproducción neuronal ocurrida durante la fase de proliferación. Se supone que la muerte neuronal durante el desarrollo constituye una "estrategia" del SN para asegurar la adecuada correspondencia espacial y numérica de las interconexiones entre los diferentes grupos neuronales (1).

El desarrollo y el mantenimiento de las neuronas depende tanto de las conexiones que establecen con sus blancos así como de las que reciben de otras

células. Se sabe que durante ciertos períodos críticos del desarrollo temprano, la actividad bioeléctrica de los impulsos aferentes juega un papel básico en la sobrevivencia de ciertas poblaciones neuronales y contribuyen al crecimiento y refinamiento de éstas.

Existen varios ejemplos de la importancia de la actividad presináptica para la sobrevivencia neuronal que incluyen a las motoneuronas, a las neuronas del sistema autónomo y a las células del sistema nervioso central como las neuronas del núcleo olivar lateral superior, las células ganglionares de la retina y las neuronas de la médula espinal, entre otras (2).

El empleo de sistemas *in vitro*, particularmente de cultivos primarios de células del sistema nervioso, ha permitido estudiar con cierto detalle los mecanismos básicos incluidos en este fenómeno. Esta preparacion refleja en gran medida los fenómenos que ocurren durante el desarrollo *in vivo*, por lo que es posible extrapolar las observaciones realizadas al animal íntegro. Los cultivos de células neurales constituyen una preparación aislada y homogénea en la que puede seguirse con exactitud el grado de maduración celular y permite el control farmacológico de algunos aspectos fisiológicos como la actividad neuronal presináptica. Así se ha demostrado, por ejemplo, que existe una clara correlación entre la actividad bioeléctrica espontánea y el índice de muerte neuronal en cultivos de células de medula espinal de embriones. La tetrodotoxina, que es un bloqueador de los potenciales de acción nerviosos, produce un incremento significativo en la mortalidad de estas células. La despolarización crónica, inducida por concentraciones altas de potasio, reemplaza al factor de crecimiento neuronal (NGF) e incrementan sensiblemente la sobrevivencia de las neuronas cultivadas de la raíz dorsal de rata (2).

Uno de los modelos *in vitro* que más se ha estudiado en este sentido son las células granulares del cerebelo. Estas neuronas requieren la presencia de concentraciones elevadas de potasio (> 20 mM) en el medio para sobrevivir (Fig 1). El efecto del potasio sobre la sobrevivencia es dependiente del calcio extracelular, ya que el uso de drogas que bloquean los canales de calcio sensibles a voltaje o compuestos quelantes del calcio inhiben completamente el efecto del potasio. Sin embargo, la incubación de estas células con A23187, un iónoforo de calcio, no produce ningún efecto en la preparación, lo que sugiere que el incremento de calcio intracelular *per se* no es suficiente para promover la sobrevivencia en estas células. Al igual que en otras células la acción de los agentes despolarizantes sobre la sobrevivencia neuronal está determinada por su edad (2). Así, las celulas granulares inician su dependencia de potasio para sobrevivir alrededor del 5º día *in vitro* (DIV). Este tiempo coincide perfectamente con el tiempo en el que las células granulares reciben la inervación de las fibras presinápticas musgosas provenientes de otras regiones del cerebro. Esto ha llevado a formular la hipótesis de que la despolarización inducida por potasio mimetiza las influencias tróficas ejercidas *in vivo* por dichas fibras y que esta influencia es requerida en un tiempo muy específico durante el desarrollo (3). Una gran proporción de las fibras musgosas utilizan al ácido glutámico como neurotransmisor. Además, las células granulares poseen receptores sinápticos para el ácido glutámico (incluyendo el tipo sensible a N-metil-D-aspartato, NMDA, que al activarse permite la entrada de calcio). Así, la hipótesis predice que la estimulación de los receptores de NMDA debe inducir la sobrevivencia de las células granulares mantenidas en un medio con concentraciones fisiológicas de potasio (5 mM), que normalmente lleva a una degeneración celular después de 5 DIV. Esta idea ha sido demostrada ampliamente y ha llevado a sugerir que durante el desarrollo *in vivo* las células granulares son insensibles al glutamato hasta el final de la migración (equivalente al 4º DIV en el cultivo) (Fig. 1). Una vez completada la migración, las células inician la diferenciación y empiezan a requerir de la influencia trófica de las fibras presinápticas mediada por el glutamato (del 5º al 10º DIV aprox.) (Fig. 1). Después de este período crítico la activación del receptor resulta tóxica para las células maduras (a partir del 14º DIV). Finalmente, en el cerebelo maduro el glutamato, a través del receptor de NMDA, sólo ejerce una débil acción despolarizante (3).

Resulta interesante el hecho de que el trasmisor

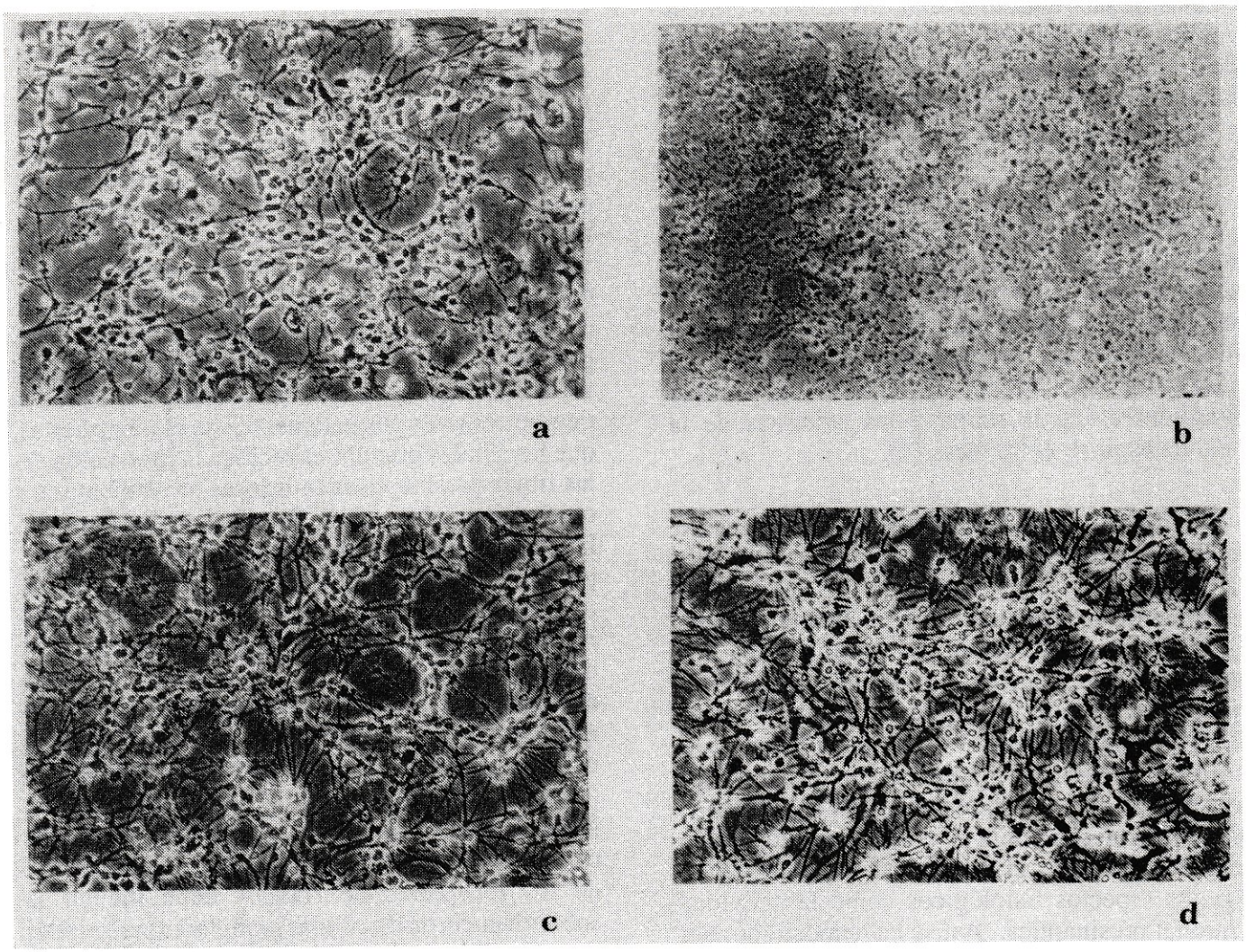

Figura 1. Efecto del potasio y NMDA en la sobrevivencia de células granulares del cerebelo de rata en cultivo. Las células de cerebelo de ratas de 8 días de nacidas fueron cultivadas por 4 u 8 días *in vitro* (DIV) en un medio con: a) KCl 5 mM (4 DIV); b) KCl 5 mM (8 DIV); c) KCl 25 mM (8 DIV); d) KCl 5mM + NMDA 150 μM (8 DIV). Nótese que después de 4 DIV (a) las células empiezan a morir (b) a menos que se traten con potasio alto (c) o NMDA (d).

excitador que más se ha asociado a las acciones tróficas es el glutamato y que sus efectos se ejercen casi exclusivamente a través de uno de sus 4 receptores sinápticos, el del tipo NMDA. Es probable que esto tenga alguna relación directa con el hecho de que éste es el único receptor sináptico que al activarse permite el paso del calcio extracelular, el cual parece jugar un papel importante en los efectos tróficos descritos. Resulta paradójico que, este mismo receptor parece ser responsable de los efectos tóxicos que tiene el glutamato en preparaciones *in vitro* de neuronas diferenciadas, así como en algunos estados neuropatológicos agudos, como anoxia e isquemia cerebral, o crónicos, como epilepsias y enfermedad de Alzheimer y Huntington (1). Al igual que los efectos tróficos, la toxicidad mediada por este receptor es muy dependiente de calcio. La diferencia entre los efectos tróficos y tóxicos parece estar dada por algún mecanismo que se expresa o se inhibe durante la madurez neuronal.

Existen pocos datos sobre el papel que puedan jugar las células gliales en la sobrevivencia neuronal asociada al desarrollo. Es posible que parte de las acciones tróficas observadas estén mediadas por las células gliales en algunas preparaciones como en el caso de las motoneuronas espinales, cuyo

índice de sobrevivencia se incrementa sustancialmente cuando se cocultivan con astrocitos. En general se acepta la idea de que la sobrevivencia o el control de la muerte neuronal programada está regulada tanto por la actividad bioeléctrica como por agentes tróficos derivados de células no neuronales (1, 4).

DIFERENCIACION NEURONAL

La actividad bioeléctrica no sólo controla la sobrevivencia neuronal sino que también induce la diferenciación de neuronas en distintas regiones del SN (2). Las células granulares del cerebelo cultivadas en un medio no despolarizante presentan características que denotan un retraso significativo en la maduración fenotípica. Este retraso se manifiesta por una ausencia de acarreador de aminoácidos, una deficiencia en la liberación estimulada del transmisor y la síntesis de proteínas específicas de adhesión, así como un retraso marcado en la expresión de los canales de calcio sensibles a voltaje y del receptor sinaptico del glutamato. Estas deficiencias, sin embargo, se corrigen si se añade al medio de cultivo una concentración alta de potasio (25 mM) o si se estimula el receptor sináptico de glutamato con su análogo el NMDA. De la misma manera, cuando estas células se estimulan crónicamente con potasio o con NMDA antes de que se haya desarrollado una dependencia de despolarización para la sobrevivencia (por ejemplo 2-4 DIV), se induce específicamente una activación de las enzimas que sintetizan su neurotransmisor sin afectar otras enzimas del metabolismo general de la célula (Fig. 2).

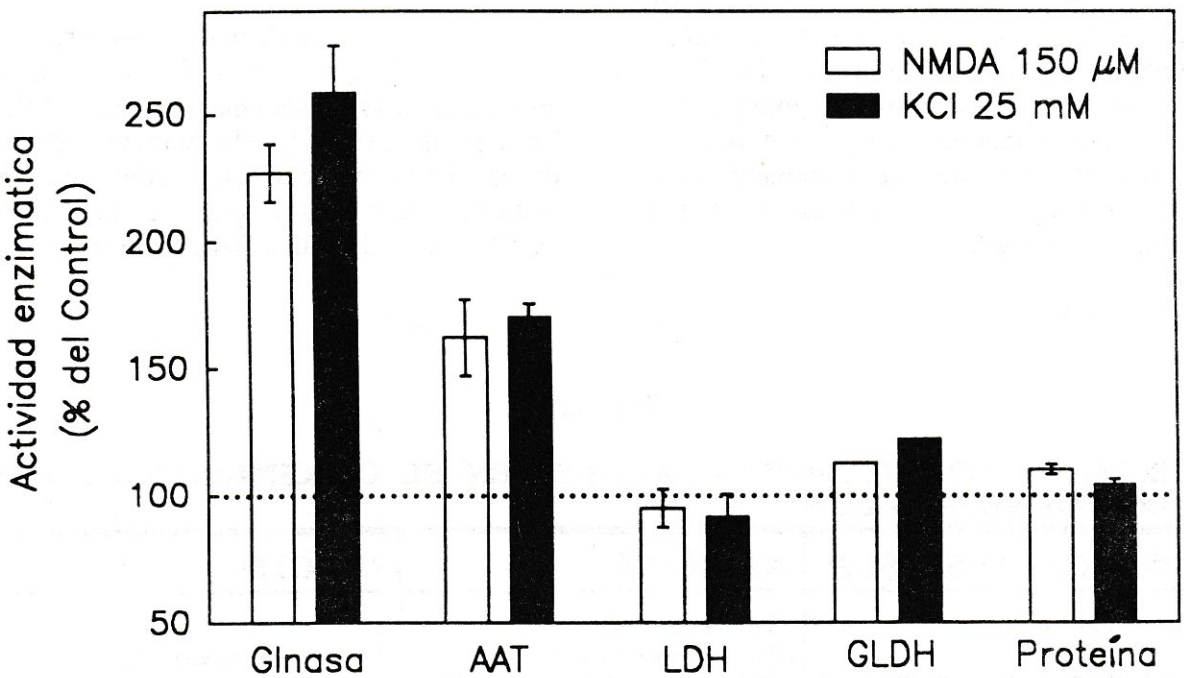

Figura 2. Efecto de KCl y NMDA en la actividad de glutaminasa (Glnasa) y aspartato aminotransferasa (ATT) de células granulares de cerebelo. El tratamiento crónico con KCl o NMDA incrementa selectivamente la actividad de las enzimas que participan en la síntesis del transmisor de estas neuronas. Otros parámetros como la actividad de las enzimas deshidrogenasa láctica (LDH) o deshidrogenasa glutámica (GLDH) y el contenido de proteína no se alteran.

Dicha inducción se observa después de 12 horas y parece requerir de síntesis de proteina de *novo*. En todas estas acciones es necesaria la presencia del calcio extracelular. *In vivo*, se ha observado que el bloqueo de estos receptores con antagonistas específicos del receptor del NMDA durante ciertos períodos críticos del desarrollo del cerebelo produce una disminución en la actividad de estas mismas enzimas. Resulta interesante el hecho de que estas acciones sólo parecen estar mediadas por uno de los

4 tipos de receptores sinápticos propuestos para el glutamato. Esta idea de que la activación del receptor del NMDA induce diferenciación neuronal, está apoyada además por el hecho de que las neuronas expresan receptores con una supersensibilidad transitoria al glutamato y que estos receptores son funcionales antes de que las sinapsis sean activas. También, existen cambios asociados al desarrollo en la vulnerabilidad de la neurotoxicidad producida por el glutamato, que es especialmente tóxico en neuronas maduras (3).

Otro transmisor que parece influir en la diferenciación neuronal es el ácido γ-aminobutírico (GABA), que en el cerebro maduro produce un marcado efecto inhibidor de la actividad nerviosa en una gran cantidad de regiones del SN (1). Durante el desarrollo, este aminoácido incrementa la expresión de receptores sinápticos de baja afinidad del propio GABA así como de otras proteínas neuronales en células granulares cultivadas. Tanto el GABA como sus agonistas o antagonistas sinápticos inducen cambios significativos en la acividad de la descarboxilasa del glutamato y en la expresión del receptor del GABA en estudios *in vivo* en retina y cerebro.

Existen pocas evidencias de acciones tróficas de las aminas biogénicas en la diferenciación neuronal (4). Se ha demostrado que la norepinefrina presente en extractos de embrión de pollo promueve la expresión del fenotipo adrenérgico en células cultivadas de la cresta neural. En el caso de la serotonina y norepinefrina se ha demostrado que la acción es indirecta por medio de la activación de la síntesis y liberación de factores tróficos gliales inducida por estimulación de los receptores de las aminas presentes en los astrocitos. Entre los factores sintetizados y liberados de los astrocitos por activación de receptores ß-adrenérgicos ó 5-HT_{1A} se incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el S-100ß, un factor específico para neuronas serotoninérgicas.

CITOARQUITECTURA

Una gran cantidad de neurotransmisores se han asociado al desarrollo de los fenómenos morfogenéticos del sistema nervioso (Tabla I) (5). Entre estos, el GABA y el glutamato parecen tener un papel fundamental. En estudios *in vivo* se ha demostrado que el bloqueo crónico de los receptores de NMDA produce una disrupción en el desarrollo

TABLA I

EFECTO DE LOS NEUROTRANSMISORES EN EL CRECIMIENTO DE LOS PROCESOS NEURONALES

NEUROTRANSMISOR	*NEURONA*	*EFECTO*
Acetilcolina	Retina de pollo Hipocampo de rata	Inhibición Inhibe en dendritas
Dopamina	Retina de pollo Ganglio de caracol	Inhibición temporal Inhibición
GABA	Hipocampo de rata	Inhibe regresión
Glutamato	Cerebelo de rata Hipocampo de rata Ganglio de caracol	Estimulación Inhibición Estimulación
Serotonina	Ganglio de caracol	Inhibición
Somatostatina	Ganglio de caracol	Estimulación

de las columnas de dominancia ocular en la corteza visual y promueve la eliminación de sinapsis entre las fibras trepadoras y las neuronas de Purkinje cerebelares. En rebanadas de cerebelo se encontró que los receptores del tipo NMDA tienen un papel central en los procesos de migración de las células granulares. Estos procesos están íntimanente ligados al crecimiento de neuritas y cambios en la citoarquitectura neuronal. En cultivos primarios el glutamato no sólo permite la sobrevivencia neuronal sino que también estimula la extensión de neuritas de células granulares de cerebelo en etapas tempranas del desarrollo (6). Las neuronas piramidales del hipocampo responden en una forma completamente opuesta a la observada en el cerebelo. A bajas concentraciones el glutamato inhibe el crecimiento de procesos mientras que a dosis altas mata a las células (Fig. 3).

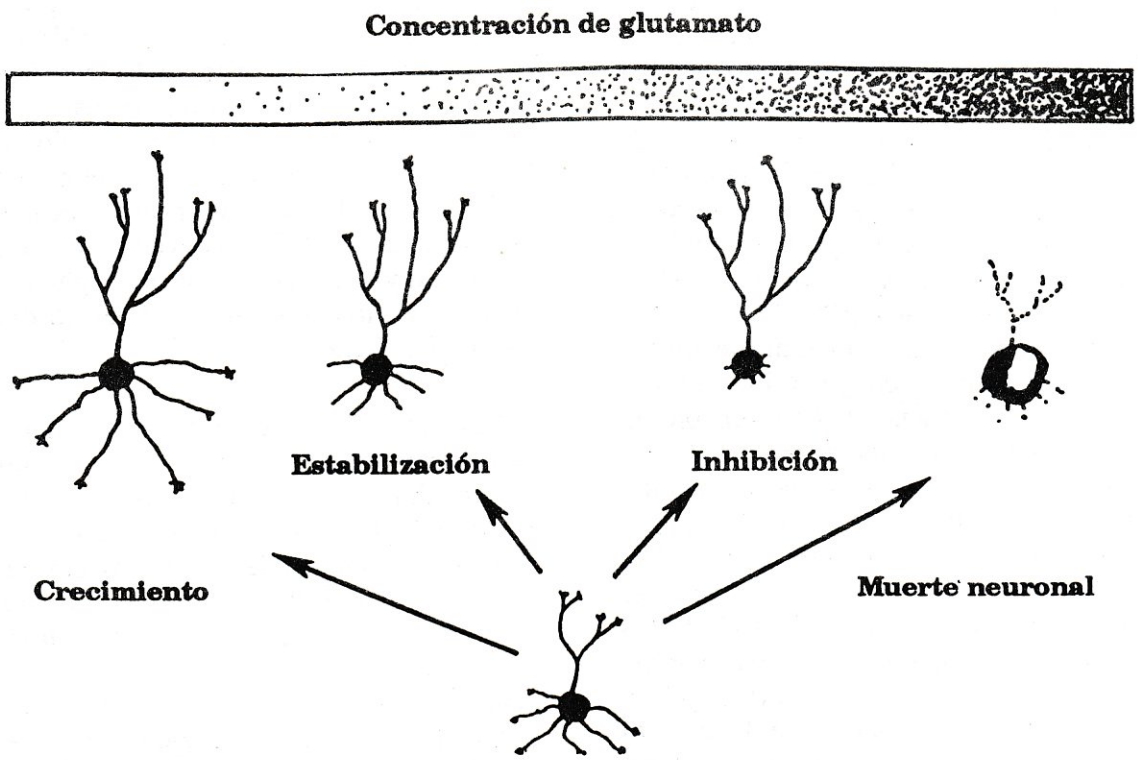

Figura 3. El glutamato regula el crecimiento de los procesos dendríticos de las neuronas del hipocampo. Las concentraciones muy bajas de glutamato no alteran el crecimiento de los procesos (izquierda); los niveles moderados llevan a una estabilización dendrítica, mientras que las concentraciones elevadas de glutamato causan una reducción de las dendritas. El glutamato es neurotóxico a concentraciones muy altas.

Una vez más el calcio y en menor grado, los nucleótidos cíclicos parecen ser los mediadores intracelulares de la señal entre el glutamato y el citoesqueleto y el aparato vesicular responsable del control de la forma neuronal (5). El GABA, además de inhibir la acción del glutamato en las células del hipocampo, promueve el crecimiento de neuritas en la retina e induce cambios a nivel ultraestructural en células granulares y retinales como la formación de sinapsis, de retículo endoplásmico rugoso, neurotúbulos, vesículas, etc (1, 6).

Otros transmisores que afectan de una u otra manera el crecimiento o retracción de neuritas son: la acetilcolina que actúa sobre células ganglionares de la retina, la serotonina que parece afectar a las neuronas del ganglio del caracol y del cerebro de los mamífero y la dopamina y

norepinefrina que modulan el crecimiento de las neuronas del *pallidum*, de la retina y de SN de los invertebrados (6). En el caso de las catecolaminas se propone que el mecanismo de acción podría ser a través del control del calcio intracelular por los niveles de AMPc (5).

DESARROLLO DE LOS ASTROCITOS

A diferencia de la gran cantidad de evidencias acumuladas en relación al papel de los neurotransmisores como señales de desarrollo de las neuronas, poco se sabe sobre el efecto de estos transmisores en el desarollo de los astrocitos y del papel de estas células en la modulación trófica de los neurotransmisores (4, 6). Es posible que durante el desarrollo, los transmisores funcionen como señales entre neuronas y células gliales e incluso entre glia y glia. Esta idea ha sido apoyada por el hecho de que los astrocitos poseen receptores sinápticos de transmisores noradrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, peptidérgicos y aminoacidérgicos y que muchos de éstos se expresan sólo durante un período particular del desarrollo. En estudios en cultivo de tejidos se ha demostrado que las influencias neuronales sobre las células gliales son necesarias para completar su diferenciación (1, 4); así se ha visto que cuando se cocultivan astrocitos del cuerpo estriado con neuronas de sustancia negra, los primeros alcanzan un alto grado de diferenciación morfológica y funcional. Cuando los astrocitos de la corteza cerebral en cultivos primarios se tratan con agonistas β-adrenérgicos éstos muestran una serie de cambios morfológicos que los hacen muy similares a la apariencia madura de los astrocitos protoplásmicos *in vivo*, mientras que los que no se tratan retienen una apariencia fibrosa. Este tratamiento además induce cambios en la expresión o supresión de algunas proteínas, de transportadores membranales y de actividades enzimáticas. Este efecto parece estar mediado por AMP cíclico ya que la incubación de estos astrocitos con dibutiril-AMP cíclico o forskolina, que estimula directamente la adenilato ciclasa, produce un efecto similar al de los β-adrenérgicos (1).

Se ha observado también que en cultivos de cerebros inmaduros de rata tanto la acetilcolina como la norepinefrina estimulan la proliferación de astrocitos, mientras que el glutamato inhibe su división. De la misma forma se ha sugerido que la serotonina podría funcionar como reguladora de la división de las células gliales antes de que este compuesto funcione como neurotransmisor. Se ha propuesto que las acciones descritas sobre la proliferación glial podrían estar mediadas por activación de la proteína cinasa C (6).

Es importante reconocer que una gran parte de los estudios sobre el papel trófico de los neurotransmisores han sido realizados en preparaciones *in vitro*, donde podrían expresarse características que no ocurren fisiológicamente. Sin embargo durante los últimos años han empezado a aparecer evidencias experimentales *in vivo* que apoyan las observaciones llevadas a cabo en células cultivadas y que hacen pensar sin lugar a dudas que las observaciones *in vitro* reflejan lo que ocurre fisiológicamente.

Las acciones de los compuestos neuroactivos deben considerarse como efectos de amplio espectro que van desde la modulación trófica descrita hasta el papel de transmisores clásicos pasando por sus influencias potenciales neurotóxicas en el SN maduro. Este espectro probablemente sea el resultado de la combinación de distintos factores que incluyen el tiempo en el desarrollo así como los desequilibrios en las concentraciones de agentes específicos. Esto puede ejemplificarse con el glutamato que parece ser absolutamente necesario para la sobrevivencia y la diferenciación de las células granulares del cerebelo inmaduro, mientras que en el adulto funciona como neurotransmisor y puede llegar a ser extremadamente tóxico.

Existe un cierto patrón que indica que las monoaminas afectan preferencialmente la diferenciación de los astrocitos, mientras que los aminoácidos como el GABA y el glutamato afecta la diferenciación neuronal. Es posible además, que muchos de los efectos tróficos de los neurotransmisores observados sobre las neuronas sean indirectos y mediados por células no neuronales. El conjunto de estas evidencias y la vasta información existente acerca de los factores

tróficos clásicos hace surgir la idea de que los neurotransmisores clásicos podrían ser los factores tróficos aportados por la inervación aferente, a diferencia de los factores neurotróficos que serían producidos por los tejidos blanco.

Aunque en los últimos años se ha avanzado sustancialmente en el conocimiento de cómo los neurotransmisores clásicos participan activamente en la diferenciación de las neuronas y las glia y de cómo algunos de estos procesos se interrelacionan durante la maduración cerebral, resulta evidente que aún estamos lejos de entender los mecanismos básicos de estos acontecimientos.

REFERENCIAS

1. Meier, E., Hertz, L. y Schousboe, A. (1991). Neurotransmitters as developmental signals. Neurochem. Int. *19*(12): 1-15.

2. Balàzs, R.. Plastic and trophic effects of amino acid transmitters in the developing nervous system. Int. J. Dev Neuroscience, *8*(4): 345-491.

3. Balàzs, R. (1988).Metabolic imbalance and nerve cell damage in the brain. Prog. Brain Res. *73*: 447-463.

4. Schwartz, J.P. (1992). Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. Int. Rev. Neurobiol. *34*: 1-23.

5. Mattson, M.P. (1988).Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. Brain Res. Rev. *13*: 179-212.

6. Mattson, M.P. y Hauser, K.F. (1991) Spatial and temporal integration of neurotransmitter signals in the development of neural circuitry. Neurochem. Int *19*(12): 17-24.

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. UNAM. Edificio "E", Lab. 312, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F. Tel. (5) 622-5306. FAX (5) 548-3227.

" SEMANA DE LA EDUCACION BIOQUIMICA "

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 ACTUALIZACION BIOQUIMICA** 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., 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. o a los teléfonos 623-21-68, 69 y 70 y Fax 616 24 19.

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

convoca al

II CONGRESO

DE LA ASOCIACION 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 deActualización 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:

M. en C. Aída Hernández Tobías / Dr. Enrique Piña Garza
Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica
Apdo. Postal 70-281, C.P. 04510, D.F. MEXICO
Tel. 623 21 68 y FAX 616-24-19

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

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

Conferencia Magistral
6 sesiones plenarias
6 simposia
Exposición de carteles

TEMAS:

Metabolismo Secundario
Interacciones Planta-Microorganismo
Fitorreguladores
Fisiología y Desarrollo
Estress
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-BIOLOGICAS, UMSNH.
MORELIA, MICH.

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

* * * ULTIMO ANUNCIO * * *

VIII CONGRESO DE BIOENERGETICA Y BIOMEMBRANAS SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA, A.C.

A los colegas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica que trabajan en los aspectos bioquímicos de la transducción de energía y en temas relacionados con la estructura y función de las membranas biológicas, les hacemos una cordial invitación para participar en el *VIII Congreso de la Rama de Bioenergética y Biomembranas.*

La sede para el congreso de 1993 será el Hotel Hacienda Cocoyoc, en el Estado de Morelos. Las fechas para esta reunión son del 7 al 11 de noviembre de 1993.

En esta ocasión, hemos invitado a participar en el congreso a cinco investigadores del extranjero: al Dr. Julian Schoeder, de la Universidad de California en San Diego (quien trabaja en la regulación de canales iónicos en plantas); al Dr. Giuseppe Inesi, de la Universidad de Maryland (quien trabaja en la Estructura/función del receptor basurero!); a la Dra. Carolyn Slayman, de la Universidad de Yale (Biología Molecular de ATPasas); al Dr. Glen A. Evans, del Salk Institute (Proyecto del Genoma Humano), y al Dr. Ricardo Miledi de la Universidad de California (Biología Molecular de Receptores).

Las cuotas de inscripción para la reunión serán de N$1,000.00 M.N. antes del 15 de agosto y N$1,200.00 después del 15 de agosto. El costo incluye la inscripción al congreso, memorias de la reunión, 4 noches en el hotel en habitación doble y 3 alimentos diarios por persona.

El formato para la elaboración de los resúmenes será del mismo tipo que los de la reunión pasada que se llevó a cabo en Tequesquitengo y se entregarán del 25 de junio al 2 de julio. La **fecha límite para la entrega de resúmenes** será el **31 de agosto**. Con el fin de mantener la tradición de tener únicamente presentaciones orales durante nuestra reunión, para así estimular la interacción y la discusión de todos los trabajos, se aceptarán únicamente **UN MAXIMO DE DOS RESUMENES** por cada laboratorio participante.

Para mayores informes, favor de dirigirse a cualquiera de los miembros del **Comité Organizador:**

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

Federico Martínez Montes
Depto. de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Apdo. Postal 70-159
C.P. 04510 México, D.F.
Tel. 623-2170

Jaime Mas Oliva
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Apdo. Postal 70-243
C.P. 04510 México, D.F.
Tel. 622-5620 FAX: 622-5611

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.