ISSN-0187/294X

BEB 94
BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

VOL. 13 No. 1 MARZO 1994

EDITORIAL

LA BIOLOGIA MOLECULAR Y LA GENETICA EN LA MEDICINA DEL FUTURO

La aplicación conjunta de técnicas de biología molecular y genética al campo de la medicina, ha traído como consecuencia un avance espectacular en la comprensión de las bases moleculares de patologías hereditarias tan diversas como la fibrosis quística o la aparición de tumores como el retinoblastoma. La aplicación conjunta de estas dos disciplinas ha avanzado en dos frentes: por una parte se ha permitido identificar a los genes responsables de la manifestación de cada una de estas enfermedades y por otra, ha hecho posible identificar los cambios específicos en la secuencia de estos genes que alteran la función normal del producto génico. Estos descubrimientos ocurrieron antes de que se iniciara el proyecto destinado a secuenciar todo el genoma humano. ¿De qué manera puede beneficiarse la medicina con el conocimiento generado por este proyecto y cuáles son las perspectivas de aplicación para la medicina?

En la actualidad la aplicación de la biología molecular a la medicina se encuentra aún restringida, principalmente a la identificación de secuencias específicas del ADN reconociendo mutaciones en enfermedades hereditarias, mutaciones en oncogenes asociados a la formación de tumores y a la detección de agentes patógenos.

Entre las enfermedades genéticas en las que la biología molecular se aplica como apoyo al diagnóstico cabe mencionar: 1) Fenilcetonuria, debida a mutaciones autosómicas recesivas del gen de la fenilalanina hidroxilasa; 2) Fibrosis quística que se presenta como resultado de mutaciones que afectan la función de un canal de cloro; y 3) Distrofia muscular, que resulta de mutaciones en el gen de la distrofina, que se hereda como un rasgo ligado al cromosoma X.

Entre los oncogenes estudiados clínicamente con técnicas de biología molecular sobresalen: *c-myc, ras, RB* y *p53* genes que al ser mutados participan

Pasa a la pág. 3

COMITE EDITORIAL

EDITOR FUNDADOR

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional

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

JAIME MAS OLIVA
Facultad de Medicina e Instituto de Fisiología Celular
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

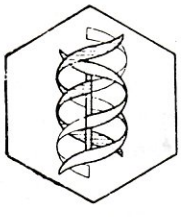
JESUS MANUEL LEON CAZARES
Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

APOYO SECRETARIAL

ELISA MORA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Medicina, UNAM



Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.

INDICE

BEB 94 Vol. 13 Núm. 1 Marzo de 1994

EDITORIAL

LA BIOLOGIA MOLECULAR Y LA GENETICA EN LA MEDICINA DEL FUTURO
María Teresa Tusie Luna y
Alejandro Zentella Dehesa 1

ARTICULOS

INFORMACION INTEGRADA vs INFORMACION AISLADA
Jesús Manuel León Cázares y María Teresa
Elizabeth Flores Rodríguez 4

LOS ESTUDIOS *in vivo* EN LA EXPERIMENTACION BIOQUIMICA. APLICACION AL ANALISIS DEL METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS: BIOSINTESIS *de novo* Y RUTAS DE *RECUPERACION*
Antonio Liras 9

MECANISMOS MOLECULARES QUE CONTROLAN LA DIFERENCIACION EN ***Strptomyces***
Luis Servín González 17

OTRAS COMUNICACIONES

DEL BUEN DECIR... (4)
Alberto Huberman Wajsman 23

RECONOCIMIENTO AL DR JESUS GUZMAN
Marietta Tuena y Victoria Chagoya 24

RECORDANDO A LA DRA AURORA BRUNNER LIEBSHARD
Jaime Mas Oliva 25

AVISOS

ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA AC, - III CONGRESO 27
XXI TALLER DE ACTUALIZACION BIOQUIMICA 28
INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA 32

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, CP 04510 México, D F. Certificados de: Licitud de Título No 6703; Licitud de Contenido No 6989; No de expediente 1/432"92"/8443; Reserva al título en derecho de autor No 6703. Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Corregio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,300 ejemplares.

Viene de la pág. 1

LA BIOLOGIA...

en la activación de diversos tipos de tumores. En estos casos los estudios se orientan a la clasificación de estadios y pueden colaborar para la prognosis del paciente. Finalmente, la detección de material genético de agentes patógenos se aplica para definir la cepa o especie infectiva.

Entre las enfermedades en las que la biología molecular ha encontrado aplicación se tienen: 1) La detección de virus como hepatitis, rotavirus y recientemente HIV; 2) La detección de parásitos como *Plasmodium* sp, responsable del paludismo; *Leishmania* sp responsable de la enfermedad de Chagas; y *Tripanosoma* sp, responsable de la tripanosomiasis.

De entre todas estas aplicaciones no es casual que haya sido en el área de la genética humana en la que la biología molecular prometa aplicaciones que vayan más allá del valor diagnóstico. Una de las grandes limitaciones que ha tenido el estudio de las enfermedades hereditarias en el hombre ha sido el tamaño del genoma humano y la falta de suficientes puntos de referencia para orientarse dentro de él. Si bien la genética puede identificar si una enfermedad genética es hereditaria o congénita, también puede determinar la localización del gen que participa. Sin embargo, la identificación de la posición de uno de entre tantos genes, requiere de puntos de referencia o marcadores genéticos que permitan determinar la distribución de las distintas regiones del genoma. La biología molecular ha contribuido, justamente en este punto, de manera definitiva, permitiendo establecer puntos de referencia que a su vez crean la posibilidad de identificar el lugar físico del genoma en el que radica el error que da origen a la enfermedad.

El gran proyecto del genoma humano emprendido por la comunidad científica internacional consiste en la aplicación y la formulación de nuevas técnicas de biología molecular destinadas a la obtención de un mapa físico del genoma humano. Uno de los objetivos explícitos es la secuenciación de todo el genoma humano. Para facilitar este proceso de mapeo, diversos grupos han comenzado por generar un gran número de marcadores genéticos. A largo plazo este esfuerzo permitirá la identificación y la localización de nuevos genes lo que ayudará a entender las bases moleculares de muchas enfermedades, pero de inmediato ha abierto una nueva dimensión para el estudio de las enfermedades hereditarias, gracias a la identificación de un gran número de marcadores genéticos. Esto hará posible la localización de genes asociados o responsables de enfermedades genéticas en las que el gen responsable de la enfermedad aún se desconoce.

El gran salto por venir se dará cuando la biología molecular pase de ser una herramienta de apoyo en el diagnóstico y la clasificación de patología y se convierta en una herramienta terapéutica y profiláctica. La primer fase, a la que se denomina terapia génica, corresponde al uso de un gen normal para corregir un gen dañado cuya manifestación se refleja como una enfermedad genética. Un ejemplo de terapia génica es la introducción del gen de la adenosina deaminasa en pacientes con Leish Nijan, que son deficientes en esta enzima. La segunda fase, la terapia génica de manera profiláctica, corresponde a la introducción de genes normales antes de que se manifieste la enfermedad. El uso profiláctico de esta tecnología es aún lejana, pero su aplicación se desprenderá de los modelos utilizados en la terapia génica.

Es importante que los profesores del área de cienicas básicas se mantengan actualizados ante este panorama de la biología molecular y la genética en el campo de la medicina, para que los estudiantes de medicina que hoy se encuentren en formación, tengan la preparación técnica y humanística que les permita formar parte de la práctica médica del futuro.

Ma. Teresa Tusie Luna y*
*Alejandro Zentella Dehesa***
**Unidad de Genética de la Nutrición, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.*
*** Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.*

INFORMACION INTEGRADA vs INFORMACION AISLADA*

Jesus Manuel León Cázares y María Teresa Elizabeth Flores Rodríguez. Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 70-381. México 04510, D.F.

RESUMEN

Con base en la importancia que los principios de la Biología Celular tienen en la formación del criterio biológico (1), no sólo de los estudiantes de las carreras en las áreas denominadas químico biológicas y biomédicas, sino incluso de los alumnos del nivel medio superior, se presenta una propuesta, basada en parte en la estructura de la obra de Christian de Duve *Una visita guiada de la célula viva* (2), de cómo organizar la exposición de temas que por tradición se han tratado bajo un esquema descriptivo fraccionado, como el que se usa en algunos de los textos más utilizados en los cursos convencionales de Biología Celular, como el Alberts y colaboradores (3) o el Darnell y colaboradores (4), en los que varios capítulos se refieren a *La membrana plasmática, El núcleo celular, El citoesqueleto*, etc, como si se tratara de componentes que existen y actuan en forma aislada y sin relación unos con otros. Se discuten los resultados de haber puesto en práctica, a nivel de cursos de licenciatura y de actualización para profesores de enseñanza media superior, esta misma propuesta.

PALABRAS CLAVE: Biología celular, enseñanza aprendizaje, integración de conceptos.

ABSTRACT

Based on the importance that the Cell Biology principles have in the formation of the biological criteria (1), not only of the students of the carrers of the so called chemical biological and biomedical areas, but even of the pupils of the high schools, it is presented a proposition, partly based in the estructure of Christian de Duve's *A guided visit to the living cell* (2), of how to organize the exposition of several items that traditionally has been treated under a descriptive and fractionated manner, like the one used in some of the most employed textbooks in the conventional courses in Cell Biology, like the Alberts *et al* (3) or the one by Darnell *et al* (4) in which several chapters are presented as *The plasma membrane, The cell nucleous, The cytoskeleton*, etc, as if they were parts that exists and performs in an isolated way and with no relationships between them. The results obtained of applying this proposal in courses of the bachellor degree and for the actualization of high scholl teachers, are discussed.

KEY WORDS: Cell Biology, teaching and learning, concepts integration.

¿Qué tipo de información debería incluirse en el curriculum del estudiante de una carrera biológica para una formación adecuada en el área de la Biología Celular?

Al considerar que la Biología moderna se basa en tres grandes generalizaciones: la *Teoría Celular*, las *Leyes de la Herencia* y la *Teoría de la Evolución*, resulta obvio el sitio que la Biología Celular deba tener en el *curriculum* de una carrera que intenta preparar personal especializado en el análisis, entendimiento y manejo de los diversos fenómenos biológicos, que se presentan en diferentes niveles de complejidad.

Para lograr esa preparación, se hace necesario el desarrollo de un criterio celular, que permita dar sentido, localización y bases a las posibles interpretaciones que se puedan proponer sobre

*Trabajo presentado durante el II Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C.

los distintos aspectos del fenómeno de la vida.

La formación del criterio requiere no sólo de la acumulación de grandes cantidades de datos, sino de que el alumno desarrolle su intelecto y se capacite en el uso de los acervos de información, para que pueda plantear soluciones a los problemas a que habrá de enfrentarse. Esto hace necesario que desde el inicio de su formación, intervenga en forma activa y seria en la investigación, lo que en principio puede hacerse por medio de la "duplicación" de los diversos experimentos clásicos, que generaron algunos de los conceptos más sobresalientes en la Biología Celular y más tarde por medio de su participación en proyectos formales, de tal manera que llegue a ser capaz de llevar a cabo el análisis de cómo es que han surgido los conocimientos en diversas áreas, desde las ideas más incipientes hasta el desarrollo de los modelos más complejos, con que se han tratado de explicar distintos aspectos relacionados con las manifestaciones de los organismos vivos.

Para esto se necesita del conocimiento de los antecedentes sobre las circunstancias, los personajes y las ideas que han hecho posible el paso de la mera descripción de la forma de las células, a la comprensión, más o menos detallada, de su papel como unidades estructurales, de funcionamiento, de reproducción e incluso de patología, de los organismos vivos.

Como requisito para instrumentar un sistema que permita que en algún momento los alumnos participen en las tareas de investigación, se deberá tener en cuenta la necesidad de descubrir, fomentar y reforzar, las actitudes congruentes con lo que Weisskopf en 1972 (5), definió como las razones principales por las que se lleva a cabo la investigación científica, que son: a) El interés por entender a la naturaleza, b) El impulso de observar, clasificar y continuar con la observación de los fenómenos por los fenómenos mismos y c) La necesidad de profundizar sobre un problema mediante la experimentación, con la naturaleza, por medio del uso del ingenio para estudiar el fenómeno en condiciones especiales y aún poco comunes. Todo esto con objeto de encontrar relaciones y dependencias, causas y efectos, leyes y principios.

Otro aspecto importante que le permitirá capacitarse en el estudio de los fenómenos biológicos, es el desarrollo de su actitud crítica, la que se supone que se forma en un medio donde a las explicaciones de los fenómenos y sobre todo de los fenómenos biológicos, se les da el valor de interpretaciones conceptuales, es decir, de hipótesis de trabajo, de modelos y no de dogmas. Esta actitud debe generar en el individuo una opinión propia sobre esas explicaciones, que desde luego no puede ser gratuita, sino que estará formada con base en los conocimientos previos, es decir los antecedentes, que son los que le permitirán formarse un criterio acerca de esas concepciones y necesariamente le producirán la sensación de que puede haber, dentro del mismo marco de referencia, más de una explicación para cualquier fenómeno, lo que aumentará su habilidad para analizar con criterio cualquier información.

Uno de los métodos más eficientes que permiten el análisis de la información, de una manera crítica y profunda, es el de conocer, de primera mano, cómo fue que se llegó a las conclusiones que soportan los conceptos que se manejan y para esto se requiere estudiar los reportes originales, es decir el testimonio de aquellos expertos que participaron directamente en la generación de las preguntas, en el diseño de los métodos para tratar de contestarlas y en las aplicaciones de éstos a la obtención de las evidencias, que forman la base de las posibles respuestas, que una vez sometidas a la opinión de las comunidades de intereses de los especialistas en el campo e incluso a la opinión pública, permiten plantear las nuevas interrogantes, que son en realidad la materia prima del avance de cualquier conocimiento y que por lo general son el producto más valioso de la investigación.

De esta manera, el desarrollo de la biología celular se entiende, no como el resultado de la casualidad, sino de la integración, siempre sobre la base de los antecedentes, de nuevas concepciones que han originado los enfoques novedosos a las interpretaciones que el sentido común, la experiencia y la investigación, señalaron desde un principio como las más adecuadas, sin olvidar que, como ya se dijo, en muchas ocasiones se

hará necesario tomar en cuenta que para un mismo fenómeno existen interpretaciones diferentes e incluso contradictorias, que deberán ser consideradas como elementos de juicio, como meras hipótesis de trabajo o modelos, de manera que cada alumno podrá, sobre la base de su criterio y sus propios antecedentes, elegir entre las opciones e incluso ser capaz de proponer alternativas diferentes con bases lógicas y argumentos sólidos.

Una parte fundamental del criterio que se forme, como resultado del estudio de la biología celular, será el del origen de las primeras células (6), que necesariamente llevará a la consideración de las condiciones ambientales primitivas en el planeta, que a su vez son parte de otros fenómenos que también tienen antecedentes y que definen las características que hicieron posible las grandes etapas del proceso que llevó, por ejemplo, de los monómeros a los polímeros, de éstos a la protocélulas y por último a las células, así como a la definición de diversos escenarios para estos acontecimientos.

A partir de aquí se hará necesario no perder en ningún momento el enfoque evolutivo, que permite el entendimiento de la estructuración de diversos mecanismos, que hacen posible que se definan las propiedades fundamentales de las células, como unidades capaces de interactuar contínua, recíproca y de manera inevitable con el medio, de una forma por demás íntima, que Carrel en 1931 (7) denominó *continuidad fisiológica*, tan estricta como la que se puede observar entre el núcleo y el citoplasma de los eucitos y que lo llevó a definir como sujeto del estudio de la biología celular, a lo que denominó sistema *"célula-ambiente"*.

El enfoque de cambios en el tiempo, permitirá el entendimiento de las relaciones de origen y descendencia que emparentan a todos los organismos vivos y la ubicación de los diferentes niveles de complejidad celular, desde los protocitos más primitivos hasta los conjuntos de eucitos más complicados. Esto originará un criterio de continuidad del fenómenos de la vida, que ha producido un gigantesco espectro de variabilidad, que en la actualidad se organiza en los cinco Reinos (8): *Monera, Protoctista, Hongos, Plantas* y *Animales*, que sin embargo mantiene niveles importantes de unidad, es decir de comunes denominadores, que hacen posible el estudio de los fenómenos integrados en mecanismos básicos, como los de obtención y manejo de la energía, los de la biosíntesis o bien los de su reproducción, que se encuentran representados de manera similar, en cuantos ejemplos se quieran utilizar para ilustrarlos.

Sobre este planteamiento se ha diseñado un curso de actualización para profesores de enseñanza media superior, con un temario como el que se muestra en la figura 1, que se ha impartido ya en dos versiones: la primera para el Colegio de Bachilleres de la Secretaría de Educación Pública y la segunda para las Preparatorias y los Colegios de Ciencias y Humanidades, de la Universidad Nacional Autónoma de México, cuyos resultados, según la opinión de los profesores que los cursaron, fueron positivos, pues les permitieron integrar desde los fenómenos relacionados con el origen del universo hasta los aspectos más recientes de la evolución del intelecto.

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CURSO INTERANUAL PARA PROFESORES DE
ENSEÑANZA MEDIA SUPERIOR
1993

ORIGEN Y EVOLUCION CELULAR

TEMARIO

I - LOS ANTECEDENTES: Los orígenes y la evolución del pensamiento sobre el asunto. Los filósofos Eleatas. El abandono y el resurgimiento de los enfoques evolutivos.

II - LA EVOLUCION COSMICA: El origen del Planeta. La atmósfera secundaria.

III - LA EVOLUCION QUIMICA: Los monómeros, los polímeros y los principales modelos de protobiontes.

IV - LA EVOLUCION ORGANICA: Protocitos, eucitos y pluricelulares. La biodiversidad.

V - LA EVOLUCION INTELECTUAL: Los primeros indicios. La actualidad del asunto del origen y la evolución celular. La exobiología. El criterio Biológico.

Figura 1. Se muestra el temario del curso de actualización para profesores de enseñanza media superior que, sobre el tema de Origen y evolución celular, se ha impartido a los profesores del Colegio de Bachilleres de la Secretaría de Educación Pública y a los de las Preparatorias y Colegios de Ciencias y Humanidades de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Debido a la aparente diversidad de las unidades celulares, es necesario llevar a cabo el estudio de las diferencias y semejanzas entre los principales niveles de complejidad celular, desde un punto de vista no de la mera descripción de sus constituyentes, sino de su papel dentro de los patrones de funcionamiento del conjunto. Para esto es recomendable que en lugar de la descripción de los componentes aislados de una célula, el estudio se realice con base en fenómenos celulares, como por ejemplo los procesos de comunicación celular o el circuito endo-exocitosis en una célula especializada, como modelos que permitan establecer una forma integrada de comprender la relación denominada estructura/función, en que se incluyen diversas "partes" que si se consideran por separado y como compartimentos aislados y sin relación en su origen y evolución, pierden su contexto y resultan en explicaciones o descripciones áridas, más propicias para la memorización que para la reflección, la comprensión y el aprendizaje.

En lo que se refiere a utilizar un concepto básico, para integrar diversos fenómenos celulares, se diseñó un curso optativo para la Carrera de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, cuyo tema central es la *comunicación* (Fig 2). De este curso se han impartido 34 versiones semestrales y los resultados, según la opinión de los alumnos, han sido positivos sobre todo en los aspectos relacionados con la comprensión

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

SEMINARIO DE BIOLOGIA "C" (Biología Celular II)

PROGRAMA PARA EL SEGUNDO SEMESTRE DE 1993

TRIGESIMA CUARTA VERSION (Marzo a Agosto de 1993)

I - *COMUNICACION*

TEMAS BASICOS

1) Comunicación

2) Comunicación celular

3) Comunicación celular defectuosa

Figura 2. Se muestra la parte básica del temario de un curso optativo que se imparte en la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, cuyo tema central es la comunicación.

integral de diversos fenómenos biológicos que incluyen los genéticos, los metabólicos, los inmunológicos y los neuroendócrinos, todos ellos enfocados desde el punto de vista de un común denominador: el concepto de la comunicación.

En el caso del ejemplo del circuito endo/exocitosis, sugerido para la obra de de Duve (2), que fue motivo de otro curso de actualización para profesores de las Preparatorias y los Colegios de Ciencias y Humanidades de la Universidad Nacional Autónoma de México (Fig 3), el

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CURSO INTERANUAL PARA PROFEORES DE

ENSEÑANZA MEDIA SUPERIOR

1992

EL CIRCUITO ENDO – EXOCITOSIS

TEMARIO

I - EL CIRCUITO PARA UNA PARTICULA PROTEICA.

II - PARA LAS LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD.

III - PARA UNA BACTERIA

IV - PARA UN VIRUS

V - PARA UNA CELULA INFECTADA POR UN VIRUS

Figura 3. Se muestra el temario del curso de actualización para profesores de enseñanza media superior que, sobre el tema de la endo/exocitosis, se ha impartido a los profesores de las Preparatorias y Colegios de Ciencias y Humanidades de la Universidad Nacional Autónoma de México.

tratamiento del tema incluyó: el estudio de la relación célula/ambiente y el planteamiento, "desde el punto de vista de una partícula que será fagocitada", de la apariencia externa de la célula lo que llevó al estudio del glucocalix con sus componentes y propiedades, de la membrana plasmática y sus relaciones con la corteza celular y el citoesqueleto, así como de la formación de las vesículas -vacuolas- fagocíticas, del papel del recubrimiento de clatrina que permite la vacuolización así como de la forma en que se desprende la vesícula y se sellan tanto la membrana plasmática como el tonoplasto. Para esto se tuvo que tratar adecuadamente la composición de las membranas y sus propiedades de fluidez, de dinámica de sus componentes, etc, dentro del contexto del fenómeno de la endo/exocitosis.

Dado que estos procesos requieren energía

para llevarse a cabo, también se estudió la forma en que la glucólisis y las mitocondrias producen el ATP correspondiente.

Después se revisó la manera en que el citoesqueleto (9) permite el transporte de la vacuola -fagosoma- y cómo ésta se fusiona con los lisosomas y constituye el fagolisosoma; cómo se lleva a cabo el cambio de pH causado por las ATPasas de las membranas de los lisosomas, que produce la activación de las enzimas lisosómicas y la forma en que las proteasas digieren a las proteínas y cómo es que salen los aminoácidos a la parte líquida del citoplasma.

Además se estudió la utilización de los aminoácidos por los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso, en la síntesis de las glucoproteínas propias de esa célula y la forma en que la presencia de algunos productos puede modificar la expresión de ciertos genes, además se trató lo relacionado, con diversos fenómenos como: los cambios en el núcleoesqueleto que influyen sobre la expresión génica; la transcripción, maduración y traducción, el papel del retículo endoplásmico rugoso, de los ribosomas y del tansporte al Aparato de Golgi.

Según las moléculas sintetizadas, fueran secreciones o componentes de la membrana plasmática, como es el caso de algunos receptores, se estudiaron los procesos de modificación de la estructura proteínica, que se llevan a cabo en el Aparato de Golgi, así como el empaque, transporte y fusión de las vesículas a la membrana plasmática, además de la formación de microcuerpos y lisosomas.

También se estudió la utilización de los aminoácidos por los ribosomas adosados al sistema microtrabecular del citoesqueleto (9) y la síntesis de proteínas de uso intracitoplásmico, como las del mismo citoesqueleto.

De esta manera, con base en otros ejemplos, se podrían cubrir los diversos aspectos de la dinámica celular, de una forma integrativa, que permita evaluar lo que se conoce, lo que está aún en duda y lo que todavía espera por la aplicación de nuevas ideas y técnicas, para seguir en la construcción del conocimiento de la célula, tarea por demás importante, pues como lo escribió Brachet: *"Después de todo, los límites de la comprensión del fenómeno de la vida coinciden casi a la perfección, con los límites del entendimiento de la célula"* (10).

REFERENCIAS

1. León Cázares, J M (1990) Sobre el criterio biológico Boletín de Educación Bioquímica (México) *IX*: 17-21.

2. de Duve, C (1984) A guided tour of the living cell. Scientific American Books, Inc. W H Freeman & Co, New York, N Y, USA.

3. Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K y Watson, J D (1983) The molecular biology of the cell Garland publishing Inc, New York & London.

4. Darnell, J; Lodish, H y Baltimore, D (1986) Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc. W H Freeman & Co, New York, N Y, USA.

5. Weisskopf, V F (1972) The significance of science. Science *176*: 138-146.

6. Schopf, W (1978) The evolution of the earliest cells. Scientific American *239* (3): 110-138.

7. Carrel A (1931) The new cytology. Science *73*: 297-303.

8. Whittaker, R H y Margulis, L (1978) Protist classification and the kingdoms of organisms. BioSystems *10*: 3-18.

9. Porter, R K y Tucker, J D (1981) The ground substance of the living cell. Scientific American *244* (3): 40-51.

10. Brachet, J (1975) Molecular cytology. Academic Press, Inc, Orlando, Florida, USA.

LOS ESTUDIOS *IN VIVO* EN LA EXPERIMENTACION BIOQUIMICA. APLICACION AL ANALISIS DEL METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS: BIOSINTESIS DE *NOVO* Y RUTAS DE *RECUPERACION*

Antonio Liras. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. España. C/Finisterre 11, 11º-3, 28029 Madrid, España.

RESUMEN

Los estudios metabólicos en general y el estudio del metabolismo de ácidos nucleicos en particular, se pueden desarrollar a partir de células vivas mediante estrategias *in vitro* o en estudios de incorporación *in vivo* de precursores exógenos marcados.

El docente universitario dentro del área de la Bioquímica, como responsable de una formación integral del estudiante, debe plantearse como uno de los objetivos específicos docentes en el tema de metodología bioquímica, resaltar la relevancia que pueden representar los estudios *in vivo* para el esclarecimiento de determinadas rutas metabólicas.

En este trabajo se describe la optimación del protocolo experimental para los estudios del metabolismo de nucleótidos en el crustáceo *Artemia* mediante estrategias de incorporación *in vivo*, que puede constituir el material para una sesión práctico-experimental para estudiantes de cursos superiores de bioquímica.

El metabolismo *de novo* de las purinas se analiza por la medida de la incorporación *in vivo* de glicina marcada como precursor *de novo* y de bicarbonato como precursor *de novo* de las purinas y de las pirimidinas. Las rutas de *recuperación* se estudian por incorporación *in vivo* de bases púricas libres marcadas radiactivamente como adenina, guanina o hipoxantina.

La recuperación y cuantificación de la radiactividad incorporada en nucleótidos solubles en ácido o de la fracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo por análisis en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) después de una purificación y fraccionamiento de las muestras por hidrólisis selectivas, precipitación y tratamiento con RNasa y DNasa.

PALABRAS CLAVE: Estudios metabólicos *in vivo*. Precursores marcados.

ABSTRACT

Metabolic studies, in general, and the study of nucleic acids metabolism in particular, can be performed in living cells by *in vitro* strategies or by *in vivo* incorporation studies of exogenous labeled precursors.

The university teacher in the area of Biochemistry, as responsible for the integral learning of the student, must establish, as one of the teaching specific objectives of biochemical methodology, to point out the relevance that the *in vivo* studies can represent to elucidate certain metabolic pathways.

Optimization of an experimental protocol for the study of the nucleotide metabolism in the crustacean *Artemia* by *in vivo* incorporation strategies, is here described, which constituted an advanced practical-experimental teaching session for students of biochemistry. *De novo* purine metabolism was assessed by measuring the *in vivo* incorporation of labeled glycine as *de novo* purine precursor, and bicarbonate as *de novo* purine and pyrimidine precursor. The

salvage pathway was studied from *in vivo* incorporation of labeled free purine bases as adenine, guanine or hypoxanthine.

The recovery and quantitation of radioactivity incorporated into acid-soluble nucleotides or nucleic acids fraction were performed by HPLC analysis, after purification and fractioning of samples by selective hydrolysis, precipitation and DNase treatment.

KEY WORDS: *In vivo* metabolic studies. Labeled precursors.

INTRODUCCION

Los estudios *in vitro* realizados en un tubo de ensayo, fuera de un compartimento vivo, constituyen, tan solo una orientación de los hechos que se pueden producir *in vivo*. Pueden representar una directriz para el desarrollo de algunos estudios bioquímicos pero tarde o temprano se hacen necesarios determinados estudios llevados a cabo sobre un organismo vivo o en general sobre un compartimento vivo, que ofrecen una idea más real y más de acuerdo con la realidad biológica y fisiológica del sistema bioquímico o biológico que se pretende estudiar en el laboratorio.

Hace tiempo, el estudio de determinadas rutas metabólicas y de ciertos metabolitos era una tarea ardua y difícil, siendo casi imposible la predicción *in vitro* de lo que podía suceder dentro de una célula. Sin embargo, desde finales de la Segunda Guerra Mundial, nuestro entendimiento de las rutas biosintéticas y degradativas y en general, del metabolismo de los productos naturales, se ha facilitado en gran medida por la posibilidad de la administración o incorporación *in vivo* de compuestos, principalmente marcados radiactivamente, ya que los radioisótopos posibilitan un método óptimo de marcar moléculas orgánicas que pueden ser seguidos posteriormente en su distribución y metabolismo en un animal intacto.

El docente universitario dentro del área de la bioquímica y la biología molecular y como responsable de la formación integral del estudiante, debe plantearse objetivos docentes de carácter general, pero también objetivos específicos con relación a esta disciplina. Uno de ellos dentro del tema de metodología bioquímica, podría ser el resaltar la gran relevancia que los estudios *in vivo* han representado y aún representan para la comprensión y esclarecimiento de temas tan importantes como son todos los relacionados con el metabolismo, entendido éste como el conjunto de reacciones que se dan en un organismo vivo, que condicionan en último término, el mantenimiento de la propia vida y que se sustentan en una base estrictamente bioquímica.

METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS

Los nucleótidos constituyen un grupo de sustancias de gran importancia para la comprensión del funcionamiento de la biología animal. Dentro de la célula, estos compuestos participan en diversas funciones tales como constituir determinadas fuentes de energía, ser componentes de ácidos nucleicos, ser mediadores en procesos metabólicos, además de participar en la agregación plaquetaria y en la transmisión nerviosa o bien formar parte de algunas coenzimas.

Se pueden distinguir, en general, dos tipos de rutas que constituyen el metabolismo de los nucleótidos (Fig 1): i) la vía *de novo* por la que en una secuencia de reacciones se produce IMP a partir de precursores sencillos de nucleótidos como aminoácidos, ribosa, ácido fórmico o CO_2, mediante distintos intermediarios (Fig 2), y ii) la

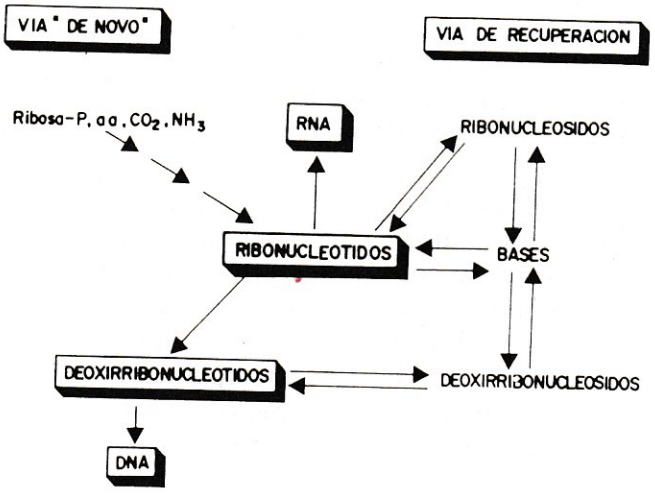


Figura 1. Diagrama de las rutas biosintéticas de los nucleótidos.

vía de *recuperación* por la que se utilizan las bases y nucleósidos ya preformados y proceden tes del metabolismo de ácidos nucleicos, o bien producidos a partir de bases exógenas en la dieta, para finalmente obtener nucleótidos (Fig 3).

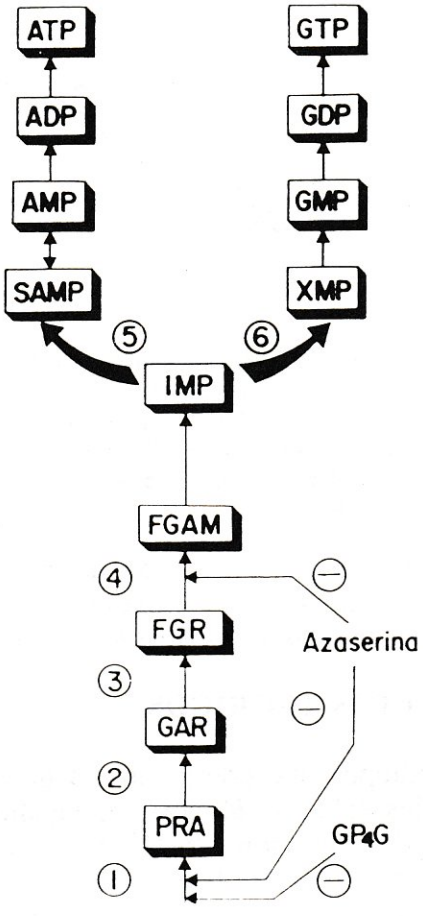


Figura 2. Biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purina. (1) Fosforribosilpirofosfato amidotransferasa; (2) Glicinamida ribonucleótido sintetasa; (3) Glicinamida ribonucleótido formiltransferasa; (4) Formilglicinamida ribonucleótido sintetasa; (5) Adenilosuccinato sintetasa; (6) IMP deshidrogenasa; GP_4G: P_1P_4-Diguanosin 5'tetrafosfato; PRPP: 5 fosforribosil-1-pirofosfato; PRA: 5 fosforribosil amina; GAR: 5' fosforribosil glicinamida: FGR: 5' fosforribosil-N-formilglicinamida: FGAM: 5' fosforribosil-N-formilglicinamida.

La concentración total de nucleótidos en la célula, que se encuentra fijada en límites muy estrechos, se basa en una regulación fina de estos dos tipos de rutas biosintéticas y su balance en una adecuada compensación con las vías de degradación de nucleótidos.

Con los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* mediante la utilización de compuestos marcados radiactivamente, se hizo posible la comprensión de estas rutas metabólicas especialmente en los años 50 con los trabajos de Buchanan y Sonne (1) en que se demostró la procedencia de los

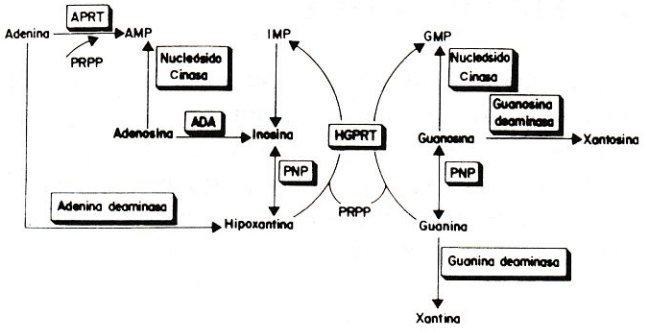


Figura 3. Rutas principales de *recuperación* de purinas libres. APRT: Adenina fosforribosiltransferasa; HGPRT: Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa; PNP: Purín nucleósidofosforilasa; ADA: Adenosina desaminasa. La recuperación de las purinas se realiza fundamentalmente por medio de cuatro tipos de enzimas: i) fosforribosiltransferasas para la adenina, la guanina y la hipoxantina que transforman las bases en los nucleósidos 5' monofosfatos correspondientes; ii) nucleósido cinasas que recuperan nucleósidos por fosforilación; iii) desaminasas de la adenina, guanosina y guanina, y iv) purín nucleósido fosforilasas que catalizan la transformación reversible entre nucleósidos y bases correspondientes.

distintos átomos que constituyen el núcleo de las purinas.

En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo diferentes estudios relacionados con el metabolismo de nucleótidos tanto por medio de metodologías *in vitro* (2) como de incorporación *in vivo* (3) de precursores exógenos marcados radiactivamente, recuperando y cuantificando la radiactividad incorporada tanto en nucleótidos de la fracción soluble en ácido como en ácidos nucleicos.

Cuando se pretende utilizar un compuesto marcado radiactivamente para estudios metabólicos *in vivo*, éste debe ser seleccionado de acuerdo al propósito que persigue el experimento en concreto. En nuestro caso particular para el estudio de las rutas biosintéticas *de novo* y de *recuperación* de nucleótidos, la elección de los precursores está de acuerdo con las caracte-

rísticas de estas dos rutas, es decir, por ejemplo, bicarbonato o glicina para el estudio de la ruta *de novo* y adenina, guanina o hipoxantina para el estudio de las vías de *recuperación*, todos ellos marcados radiactivamente con C^{14}.

OBJETIVO DOCENTE COMO SESION TEORICO-PRACTICA

La experiencia docente se puede desarrollar en cursos superiores de bioquímica, en que el alumno sea capaz de asimilar el concepto de los estudios *in vivo*, así como su trascendencia en los estudios del metabolismo intermediario. Esta sesión práctico-experimental se puede realizar en el propio laboratorio de investigación, con grupos muy reducidos de alumnos (5 a 6 alumnos) y durante un periodo de tiempo corto (1 semana). Se trataría de una sesión en parte práctica y en parte demostrativa, ya que los alumnos no están aún capacitados para desarrollar determinadas metodologías por ellos mismos, pero sí para seguir el proceso y razonamiento de la experimentación y seguir en cada paso los resultados parciales, extrayendo conclusiones al final del experimento bajo la dirección del profesor responsable.

OBJETIVO EXPERIMENTAL

En este trabajo se describe la puesta a punto, experimental de la incorporación *in vivo* de precursores marcados, aplicado al estudio del metabolismo de nucleótidos en lo que respecta a la ruta de biosíntesis *de novo* de nucleótidos purínicos y pirimidínicos así como de las rutas de *recuperación*, de tal forma que la ruta de biosíntesis *de novo* se estudia por la medida de la incorporación de glicina y bicarbonato, y la ruta de *recuperación* por la medida de incorporación de bases púricas libres como adenina, guanina e hipoxantina, todos ellos con marca radiactiva.

Esta metodología se ha aplicado en nuestro laboratorio para el estudio del metabolismo de nucleótidos durante el desarrollo larvario de *Artemia*, crustáceo anostráceo que habita en salinas sobresaturadas, capaz de sufrir fenómenos de gastrulación, estados larvarios y

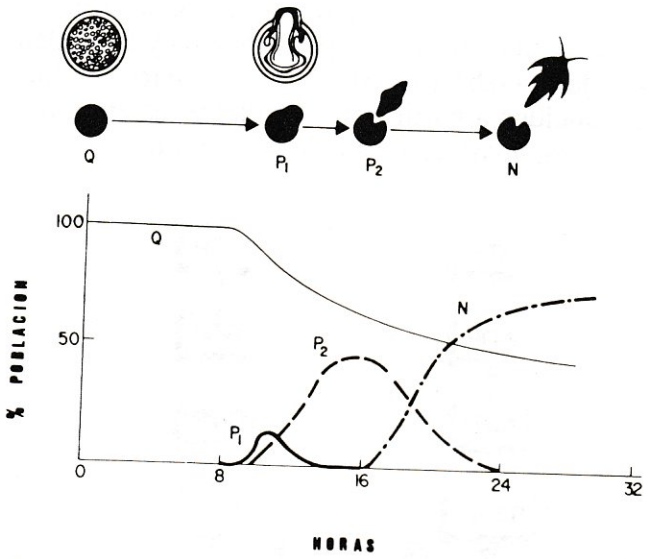


Figura 4. Desarrollo en horas, en salinidad NaCl 0.6 M, desde gástrula enquistada hasta nauplio (larva) nadador en *Artemia* y proporción del tipo de población (% de composición relativa de cada población en cada tiempo de desarrollo). Q: Quiste; P_1: Primer estadio de prenauplio; P_2: Segundo estadio de prenauplio; N: Estadio de nauplio nadador.

criptobiosis (Fig 4), y capaz de biosintetizar nucleótidos de purina y pirimidina por la vía *de novo* (4) y por las rutas de *recuperación* (5).

CONCEPTOS TEORICOS

Los isótopos que presentan una mayor utilidad en los estudios *in vivo* principalmente de rutas biosintéticas son C^{14}, H^2, H^3, N^{15}, O^{18}, S^{35} y P^{32}, cuyo marcado se lleva a cabo bien durante su síntesis orgánica o bien por intercambio isotópico después de la síntesis.

Los estudios de incorporación de precursores *in vivo*, en general, permiten la determinación de la sustancia o metabolito en que el compuesto marcado, o mejor una porción marcada de ese compuesto, se incorpora, es decir, posibilitan conocer de qué metabolito es precursora esa porción, y en segundo lugar, cuál es la extensión de incorporación. Para el cálculo de la proporción absoluta de radiactividad incorporada (PAI) expresada en Curie (Ci) = 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo, en Milicurie (mCi) o en Microcurie (μCi), se puede utilizar la expresión:

$$PAI = ([P_f] \times AS_{Pf}) / ([P] \times AS_p)$$

Donde,

[Pf] y [P]: mmoles de producto final formado y de precursor.

AS_{Pf} y AS_P: Actividad específica del producto final y del precursor, respectivamente, en mCi/mmol.

La proporción absoluta de incorporación en que la cantidad total del precursor administrado se correlaciona con la porción que es incorporada en el producto final, en ocasiones puede ser un valor de menor utilidad en determinadas investigaciones bioquímicas. Por esta razón se utilizan otros índices de incorporación como son la proporción específica de incorporación (PEI) o bien la dilución del precursor (D), cuyas expresiones son:

$$\mathbf{PEI} = AS_{Pf} / AS_P$$

$$\mathbf{D} = 1: (AS_P / AS_{Pf})$$

La utilización de uno u otro índice de incorporación dependerá de la cantidad de sustancia o producto final, que se pretende analizar y que se sintetiza durante el tiempo de experimentación, la cual puede estar sujeta a grandes variaciones. Otra condición necesaria para que el valor de la proporción absoluta de incorporación sea confiable es que el método de determinación del producto final sea de alta precisión.

La proporción de incorporación específica y el valor de dilución del precursor permiten el conocimiento de la porción del compuesto formado que se origina a partir del precursor incorporado y de aquella que se forma a partir del acervo de precursores endógenos presentes en el organismo vivo. Permiten además, concluir acerca de la relación entre el producto final formado y el precursor incorporado, así como acerca de las distintas etapas que conducen al producto final que se evalúa.

Un aspecto importante a considerar en todo estudio de incorporación *in vivo*, es el que se refiere al material biológico utilizado que no debe contener ningún otro organismo, excluyendo de esta forma la posibilidad de que el precursor se intercambie, por ejemplo, por la presencia de microorganismos, antes de que se incorpore por el organismo que es objeto real del estudio. Por lo tanto, es necesario conservar las más estrictas condiciones de esterilidad durante todo el experimento de incorporación *in vivo*.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las bases, nucleósidos y nucleótidos, así como los patrones no radiactivos de purinas y pirimidinas y las DNasa I y RNasa A, se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo.). Los compuestos radiactivos [U-^{14}C]glicina (actividad específica 110-113 Ci/mol), [^{14}C]CO_3H^- (actividad específica 60 Ci/mol), [8-^{14}C]adenina y [8-^{14}C] hipoxantina (actividad específica 55 Ci/mol) se adquirieron de Radiochemical Center Amersham (Amersham, UK); [8-^{14}C]guanina (actividad específica 55 Ci/mol) fue de New England Nuclear Corp. Eagle's Minimum Essential Medium con solución salina equilibrada fue de Grand Island Biological Co. (GIBCO), Grand Island, NY., y el DEAE-Sephacel de Pharmacia. El resto de los reactivos eran de grado analítico.

Los quistes de *Artemia* se obtuvieron de San Francisco Bay Brand Co., Menlo Park, Ca., U.S.A.

El tratamiento de estos quistes así como las condiciones de incubación de los nauplios fueron los ya descritos previamente en otros trabajos (6). Las larvas de un determinado tiempo de desarrollo (30 horas) se recogieron y filtraron en filtro poroso, se lavaron con agua destilada y se incubaron para los estudios de incorporación con precursores marcados, bajo condiciones estrictas de esterilidad.

Para los estudios de la vía *de novo* por incorporación *in vivo* con precursores [^{14}C], se utilizaron un total de 0.5 g de nauplios que se incubaron en 15 ml de agua marina artificial, compuesta por un 75% de medio Dutrieu (7) (diluido 1/5), 25% de Eagle's Minimum Essential Medium, y glucosa 5 mM, L-glutamina 5 mM, ácido aspártico 5 mM, penicilina (20.0 U/ml) y estreptomicina (1 mg/ml).

Después de 30 min de preincubación a 30° C, se añadieron, en matraces diferentes pero en iguales condiciones, los precursores marcados, de purinas ([U-^{14}C]glicina) o de purinas y pirimidinas ([^{14}C]CO_3H^-) a una concentración final de 0.3 mM y 2 mM, respectivamente, incubándose de esta forma los animales intactos y vivos, con agitación suave a 30° C, durante 4 horas.

En los estudios de las rutas de *recuperación* se partió de 0.3 g de nauplios que se incubaron en 15 ml del mismo medio que para los estudios de la vía *de novo,* suplementado con glucosa 5 mM, penicilina (20.0 U/ml) y estreptomicina (1 mg/ml). Después de 30 min de preincubación a 30° C, se añadieron en matraces diferentes los precursores de las rutas de recuperación ([8-^{14}C]adenina, [8-^{14}C]guanina o [8-^{14}C]hipoxantina), a una concentración final de 5 mM. Los animales intactos vivos se incubaron también a 30° C durante 4 horas.

Después de este tiempo, que representa el tiempo óptimo de incorporación *in vivo* en nuestras condiciones experimentales, los matraces se introdujeron en un baño frío con cloruro de sodio a -15° C, se recolectaron los nauplios por filtración y se lavaron con el correspondiente precursor no radiactivo a una concentración final de 10 mM y con ácido perclórico frío 0.5 N. Los nauplios en estas condiciones se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70° C hasta la posterior obtención de las diferentes fracciones moleculares por métodos ya establecidos mediante homogenización con ácido perclórico 0.5 N a 4° C (3).

Las fracciones solubles en ácido neutralizadas se procesaron en cromatografía de intercambio aniónico con resinas de DEAE-Sephacel, equilibradas y eluidas con agua después de aplicar la muestra hasta un valor despreciable de absorbencia a 260 nm. Los nucleótidos se eluyeron con $(NH_4)_2CO_3$ 0.5 M y se trataron con HCOOH concentrado hasta un pH de 3.0. Después de liofilizarse, los nucleótidos se redisolvieron en agua y se sometieron a una hidrólisis ácida en HCl 12 N a 100° C durante 1 h.

La fracción de ácidos nucleicos se obtuvo por métodos ya descritos (8). En las últimas etapas el RNA y DNA se precipitaron con etanol frío a -80° C durante 60 min y se redisolvieron en amortiguador TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM]. Después de digestión con DNasa I o RNasa A según el método ya establecido (9), y reprecipitación para obtener RNA o DNA respectivamente, se realizó una hidrólisis selectiva del RNA con KOH y de DNA con ácido fórmico según el método previamente descrito (10).

Los nucleótidos 2'- y 3' obtenidos a partir de las hidrólisis alcalinas de RNA, las bases libres a partir de hidrólisis con ácido fórmico del DNA y las bases liberadas a partir de nucleótidos solubles en ácido, se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en fase reversa, según condiciones ya descritas (8), excepto para el análisis de las bases liberadas por hidrólisis ácida a partir de nucleótidos solubles en ácido que se llevó a cabo en las condiciones que se describen en la figura 5.

RESULTADOS Y DISCUSION

Utilizando el protocolo experimental que se describe en este trabajo se puede desarrollar un estudio en paralelo de la ruta biosintética *de novo* de purinas y pirimidinas, y de las rutas de *recuperación* de purinas, mediante la medida de la incorpiración *in vivo* de precursores de nucleótidos marcados radiactivamente.

Estos precursores han sido [U-^{14}C]glicina como precursor *de novo* de purinas, [^{14}C]CO_3H^- como precursor *de novo* tanto de purinas como de pirimidinas, y bases libres marcadas [8-^{14}C]adenina, [8-^{14}C]guanina y [8-^{14}C]hipoxantina como precursores de las rutas de *recuperación.*

Los resultados obtenidos del análisis en HPLC, a partir de los estudios de incorporación *in vivo*, de las bases libres obtenidas de hidrolizados ácidos de nucleótidos solubles en ácido, de los nucleótidos de RNA obtenidos de hidrólisis alcalinas y de las bases libres obtenidas a partir de hidrólisis con ácido fórmico de DNA, se muestran en las figuras 5 y 6.

Los perfiles de HPLC indican que utilizando

[U-^{14}C]glicina como precursor *de novo* de purinas, la radiactividad aparece solamente en nucleótidos de adenina y guanina, y que utilizando [^{14}C]CO_3H^- como precursor *de novo* tanto de purinas como de pirimidinas, la radiactividad se incorpora, como era de esperar, tanto en nucleótidos de purina como de pirimidina, en las diferentes fracciones moleculares estudiadas en esta etapa del desarrollo larvario de *Artemia* (Fig 5).

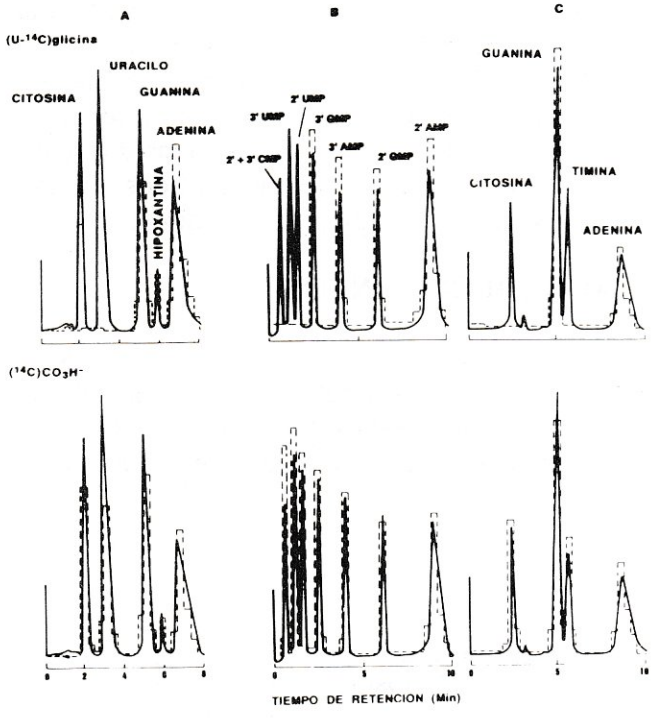


Figura 5. Perfiles cromatográficos (——) y de radiactividad incorporada (----) del análisis por HPLC de bases púricas y pirimídicas liberadas por hidrólisis ácida a partir de nucleótidos solubles en ácido (A), nucleótidos obtenidos por hidrólisis alcalina de RNA (B), y bases libres obtenidas por hidrólisis en ácido fórmico a partir de DNA (C), de nauplios de *Artemia* de 30 h de desarrollo larvario incubados en presencia de precursores marcados *de novo* [U-^{14}C]glicina o [^{14}C]CO_3H^-. Las condiciones cromatográficas fueron: (A), Columna Spherisorb C_{18}, amortiguador H_2KPO_4 0.1 M, pH 3.8, 4.0% metanol y flujo de solvente de 1.0 ml/min. (B), Columna Nova-Park C_{18}, amortiguador H_2KPO_4 0.1 M, pH 4.0, 2.5% metanol y flujo de solvente de 1.5 ml/min. (C), Columna Polygosil C_{18}, amortiguador H_2KPO_4 10 mM, pH 3.7, 5.0% metanol y flujo de solvente de 1.0 ml/min.

Por otra parte, (Fig 6) la [8-^{14}C]adenina se utiliza en nauplios de 30 h como una fuente precursora de nucleótidos de adenina y de guanina por medio de las vías de recuperación. Por el contrario, [8-^{14}C]guanina se incorpora selectivamente en nucleótidos exclusivamente de guanina y, por último, la [8-^{14}C]hipoxantina se incorpora en el acervo de nucleótidos tanto de adenina como de guanina, todo ello en las tres fracciones moleculares estudiadas, fracción soluble en ácido, RNA y DNA.

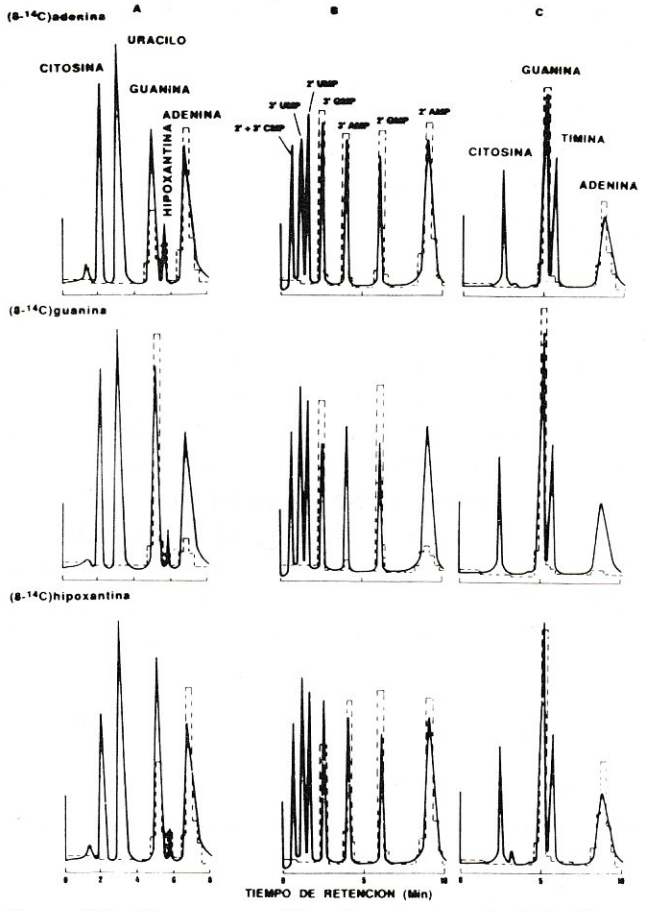


Figura 6. Perfiles cromatográficos (——) y de radiactividad incorporada (----) del análisis por HPLC de bases púricas y pirimídicas liberadas por hidrólisis ácida a partir de nucleótidos solubles en ácido (A), nucleótidos obtenidos por hidrólisis alcalina de RNA (B), y bases libres obtenidas por hidrólisis en ácido fórmico a partir de DNA (C), de nauplios de *Artemia* de 30 h de desarrollo larvario incubados en presencia de bases púricas marcadas, [8-^{14}C]adenina, [8-^{14}C]iguanina y [8-^{14}C]hipoxantina. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las descritas en la figura 5.

La resolución óptima que se obtiene en el análisis del producto final marcado radiactivamente por medio de la cromatografía líquida de alta resolución, permite la detección de nucleótidos y bases marcadas radiactivamente obtenidas a partir de nucleótidos solubles o fracción de ácidos nucleicos, así como el estudio de la distribución de la radiactividad y la medida de la actividad específica en cada componente nucleotídico biosintetizado, mediante incorpora-

ción *in vivo* de precursores marcados, especialmente en estudios que, como éste, entran dentro del área del metabolismo.

La pureza de las muestras para el análisis por HPLC, por medio de una selección de las fracciones moleculares por hidrólisis y precipitaciones selectivas, así como el tratamiento con RNasa y DNasa, permite una cuantificación óptima de la distribución de la radiactividad, evitando así determinadas señales en el cromatograma que pueden interferir o alterar el resultado final.

En función de la rapidez en la obtención de las muestras y del análisis en HPLC (tiempo de retención total inferior a 10 min), y en condiciones isocráticas de elución, estos protocolos se pueden aplicar de forma rutinaria en estudios radioisotópicos del metabolismo, en particular del metabolismo nucleotídico en *Artemia*, pero también de forma general en cualquier tipo de estudio metabólico y en otros modelos biológicos o bioquímicos, permitiendo una alta fidelidad de resultados, con extensión a otras áreas de estudio relacionadas, tales como aquellas reacciones bioquímicas en las que intervienen determinados compuestos purínicos o pirimidínicos.

Mediante la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que hace posible una alta confiabilidad y precisión en este tipo de estudios, en nuestro laboratorio se ha demostrado la existencia de la biosíntesis *de novo* de nucleótidos en el crustáceo *Artemia* (4), que hasta ese momento no estaba descrita y la influencia de determinados factores ambientales y experimentales que pueden condicionar la funcionalidad de esta vía, así como las diferentes rutas de *recuperación* de nucleótidos en este mismo sistema biológico de estudio (5).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a María del Carmen Hernández Cruz, estudiante de doctorado, su especial participación en la puesta a punto de la metodología experimental utilizada y descrita en este trabajo.

REFERENCIAS

1. Buchanan, J M y Sonne, J C (1946) The utilization of formate in uric acid synthesis. J. Biol Chem *166*: 781-787.

2. Liras, A, Argomaniz, L y Llorente, P (1990) Presence, preliminary properties and partial purification of 5-phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Artemia* sp. Biochim Biophys Acta *1033*: 114-117.

3. Liras, A (1988) Regulación de la biosíntesis *de novo* de purinas en nauplias de *Artemia* e influencia de factores experimentales. En Tesis Doctoral. Editorial Universidad Complutense de Madrid. España.

4. Liras, A, Rotllán, P y Llorente, P (1992) *De novo* purine biosynthesis in the crustacean *Artemia*: Influence of salinity and geographical origin. J. Comp Physiol B *162*: 263-266.

5. Rotllán, P, Liras, A y Llorente, P (1993) Salvage and interconversion of purines in developing *Artemia*. Biochim Biophys Acta *1156*: 128-134.

6. Liras, A, Hernández Cruz, M C, Rotllán, P, Argomaniz, L y Llorente, P (1989) *De novo* biosynthesis and base composition of total and ribosomal ribonucleic acids during early development in *Artemia sp.* FEBS Lett *255*: 358-360.

7. Dutrieu, J (1960) Observations biochimiques et physiologiques sur le d'eveloppent d'*Artemia salina*. Leach Arch Zool Exp Gén *99*: 1-34.

8. Liras, A (1991) A simple and rapid experimental protocol for studies of nucleic acids metabolism and their base composition. J Biochem Biophys Meth *23*: 189-192.

9. Maniatis, T, Fritsch, E F y Sambrook, J (1989) Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. DNA sequencing. En Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. pp. 9. 16-9. 19 y 13.28.

10. Davidson, J N (1972) The structure of RNA. En The biochemistry of the nucleic acids. Chapman and Hall. Norfolk. pp. 106-107.

MECANISMOS MOLECULARES QUE CONTROLAN LA DIFERENCIACION EN *Streptomyces*

Luis Servín González, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apartado Postal 70228. México, D.F. 04510.

RESUMEN

Las bacterias pertenecientes al género *Streptomyces* se caracterizan por ser miceliares y por presentar en su ciclo de vida una diferenciación morfo-fisiológica única dentro de los procariotos. El proceso de diferenciación en estos organismos ha sido estudiado recientemente a nivel molecular. Se presenta el conocimiento que actualmente se tiene acerca de dos genes que participan en el control de la diferenciación y de sus productos. Se trata del gen *bldA*, cuyo producto es un tRNA para un codón sumamente raro en genes de *Streptomyces* y del gen *whiG*, el cual codifica un factor sigma de la RNA polimerasa.

PALABRAS CLAVE: *Streptomyces*, diferenciación, micelio, esporulación, antibióticos, tRNA.

ABSTRACT

The bacteria belonging to the *Streptomyces* genus are characterized by a mycelial growth habit and by having a life cycle with complex morpho-physiological differentiation, unique among the prokaryotes. Differentiation in these organisms has recently been the subject of studies at the molecular level. In this review the knowledge about two genes and their products, involved in this differentiation process is presented. These are the *bldA* gene, whose product is a tRNA for a codon extremely rare in *Streptomyces* genes, and the *whiG* gene, which encodes an RNA polymerase sigma factor.

KEY WORDS: Streptomyces, differentiation, mycelia, sporulation, antibiotics, tRNA.

INTRODUCCION

Las bacterias pertenecientes al género *Streptomyces* poseen varias características poco comunes; tal vez la más interesante es su ciclo de vida. A diferencia de la mayoría de las bacterias, que son unicelulares y se multiplican por división binaria, los *Streptomyces* presentan un tipo de crecimiento vegetativo miceliar en el que las hifas cenocíticas de aproximadamente 1 μm de diámetro crecen por extensión apical para formar un micelio ramificado, que se nutre principalmente de compuestos insolubles presentes en los suelos (su hábitat natural), mediante la secreción de una variada gama de enzimas hidrolíticas extracelulares. Una vez que los nutrientes se han agotado, comienza un complejo proceso de diferenciación morfo-fisiológica, único dentro de las bacterias. La diferenciación comienza con el surgimiento de hifas aéreas que crecen nutriéndose de la lisis del micelio vegetativo. Posteriormente las hifas aéreas comienzan a enroscarse y a septarse para dar lugar a la formación de esporas, las cuales adquieren pigmentación al madurar. Las esporas constituyen la única etapa en el ciclo de vida en que se observa la característica unicelular, ya que al germinar éstas vuelven a generar un micelio vegetativo. Aunada a la diferenciación morfológica existe una diferenciación fisiológica que tiene características importantes para la biotecnología, ya que es en la etapa de diferenciación en la que se producen metabolitos secundarios, que el humano explota por sus propiedades farmacológicas. El metabolito secundario de los *Streptomyces* que nos es más familiar es un compuesto muy volátil llamado geosmina, el cual imparte a los suelos su olor característico: el famoso olor a "tierra mojada". Los metabolitos secundarios más importantes producidos por el género *Streptomyces* son los antibióticos; baste mencionar que más del 60% de los antibióticos conocidos son producidos por miembros de este gé-

nero bacteriano; además son capaces de producir una gran variedad de compuestos con propiedades farmacológicas, como son agentes antitumorales, herbicidas, helminticidas, etc. Lo anterior refleja el variado y extenso metabolismo secundario de estos organismos. El entendimiento, a nivel bioquímico y molecular, de los mecanismos que regulan la diferenciación, cobra interés no sólo desde el punto de vista básico, sino también desde el punto de vista aplicado. Es evidente que si se llegan a comprender los mecanismos que controlan la diferenciación se podrán llegar a manipular con el fin de mejorar en una forma racional la producción de antibióticos por parte de estos organismos (1).

Las bacterias del género *Streptomyces* no son únicas sólo por sus procesos de diferenciación morfo-fisiológica, sino que presentan características genéticas y moleculares muy especiales. Una de las más interesantes es que su DNA presenta el contenido de guanina (G) y citosina (C) más alto conocido para cualquier bacteria, llegando a ser de alrededor del 73%. Este elevado contenido de G+C trae como consecuencia que el uso del código genético en los genes de estas bacterias se encuentre sumamente desviado hacia la utilización preferencial de codones que tienen G o C en la tercera posición (la más degenerada dentro del código genético); de esta forma más del 90% de los codones de un gen tienen, en promedio, G o C en la tercera posición. El contenido de la primera posición de los codones también refleja una desviación considerable, lo cual se debe principalmente a que para los aminoácidos leucina y arginina es posible escoger entre codones que llevan citosina en la primera posición sobre codones que llevan adenina o uracilo. De esta manera el contenido promedio de G+C en la primera posición de los codones es significativamente mayor (60 al 70%) al de la segunda posición, que tiene el contenido de G+C más bajo, de alrededor del 50% (2). Como se verá más adelante este uso tan particular del código genético tiene características interesantes desde el punto de vista del control de la diferenciación.

A pesar de sus características morfológicas tan particulares, y a pesar de su nombre, los *Streptomyces* son eubacterias típicas. Pertenecen a la división de las bacterias Gram-positivas y poseen un mapa genético circular. Además tienen una gran cantidad de elementos extracromosómicos, tales como plásmidos de alto o bajo número de copias y bacteriófagos, que han permitido generar una amplia serie de vectores de clonación genética. Actualmente se cuenta con sistemas muy bien desarrollados de clonación de genes, que permiten manipular a estos organismos en una forma muy parecida a como se manipula a la conocida *Escherichia coli.* Estos sistemas de clonación han permitido el análisis de la expresión de numerosos genes de *Streptomyces*, lo cual hubiera resultado sumamente difícil en *E coli*, ya que el alto contenido de G+C en el DNA de *Streptomyces* casi siempre impide que se pueda expresar fuera del propio género.

EXISTEN MUTACIONES QUE AFECTAN EL PROCESO DE DIFERENCIACION

Los primeros análisis genéticos tendientes a explicar el proceso de diferenciación en estos organismos consistieron en el aislamiento de cepas mutantes incapaces de seguir un proceso normal de diferenciación. Las colonias de *Streptomyces* crecidas sobre medios con agar presentan normalmente un aspecto liso y brilloso durante la etapa de crecimiento del micelio vegetativo. Después de unos días de incubación el aspecto de las colonias cambia con el surgimiento del micelio aéreo, de coloración blanca, que imparte a las colonias una aspecto aterciopelado o velludo; posteriormente, al transformarse el micelio aéreo en esporas maduras la coloración de las colonias cambia, puesto que las esporas adquieren pigmentación, normalmente grisácea.

La mayoría de las cepas mutantes afectadas en diferenciación pueden ser divididas por su aspecto en dos grandes grupos, el de las mutantes Bld o "calvas" (del ingles *bald*) y el de las mutantes Whi o "blancas" (del inglés *white*). Las primeras reciben este nombre porque sus colonias tienen un aspecto liso y son incapaces de producir micelio aéreo y esporas, aún después de una incubación muy prolongada; es decir son mutantes afectadas en todo el proceso de dife-

renciación. Las segundas sí son capaces de producir micelio aéreo (es decir, no son "calvas"), pero éste conserva su aspecto blanquecino aún después de una incubación prolongada, lo cual se debe a la incapacidad de producir esporas maduras y pigmentadas; es decir, en estas mutantes es posible desarrollar micelio aéreo, pero la diferenciación se detiene en ese punto (Fig 1).

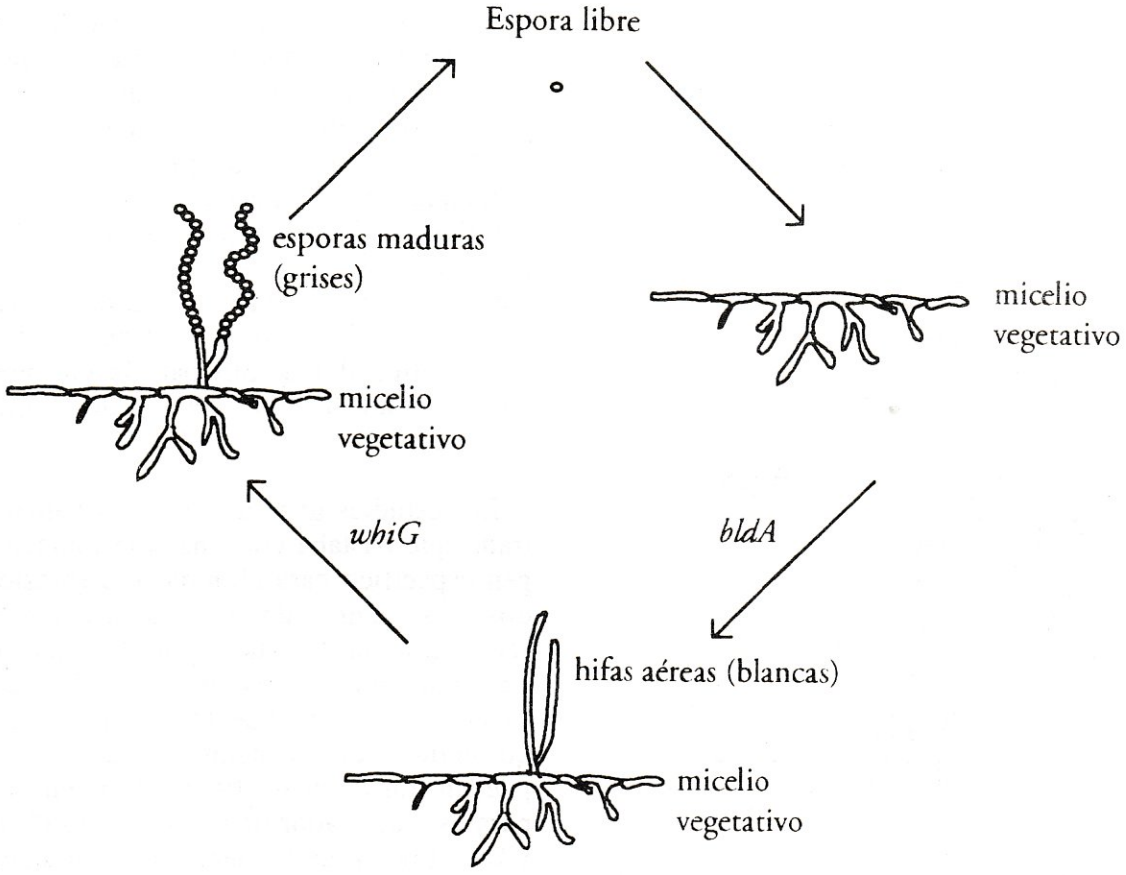


Figura 1. Esquema simplificado del ciclo de vida de *Streptomyces*. Se muestran los pasos que se encuentran afectados en cepas con mutaciones en el gen *bldA* o en el gen *whiG*.

Con el desarrollo de los métodos para hacer ingeniería genética en *Streptomyces* ha sido posible clonar algunos de los genes que codifican para factores que intervienen en la diferenciación. Aunque es imposible cubrir aquí todo lo que actualmente se sabe sobre estos genes, sí es posible describir algunos de los aspectos más importantes de dos de ellos.

EL INICIO DE LA DIFERENCIACION EN *Streptomyces* ESTA CONTROLADO TRADUCCIONALMENTE, A TRAVÉS DE UN RNA DE TRANSFERENCIA

Uno de los primeros genes de diferenciación en ser clonados fue el gen *bldA* que, como indica su nombre, era capaz de restaurar a cierto grupo de mutantes "calvas" la capacidad de diferenciarse, cuando era introducido a éstas ya sea en un vector plasmídico o fágico. Curiosamente, al analizar el DNA clonado que restauraba la capacidad de diferenciación se encontró que no se trataba de una región codificadora de proteínas, es decir, no era una proteína estructural o una enzima la que estaba afectada en dichas cepas mutantes. El análisis de la región clonada demostró que en ella se encontraba codificado un RNA de transferencia (tRNA); al clonar y secuenciar esta misma región de cepas con mutaciones *bldA* se observó que las mutaciones afectaban la estructura del tRNA, haciendo que esta molécula no fuera funcional. Con

base en la secuencia de este tRNA (en particular de la región del anticodón) fue posible deducir que se trataba de un tRNA responsable de traducir codones UUA para el aminoácido leucina (3, Fig 2).

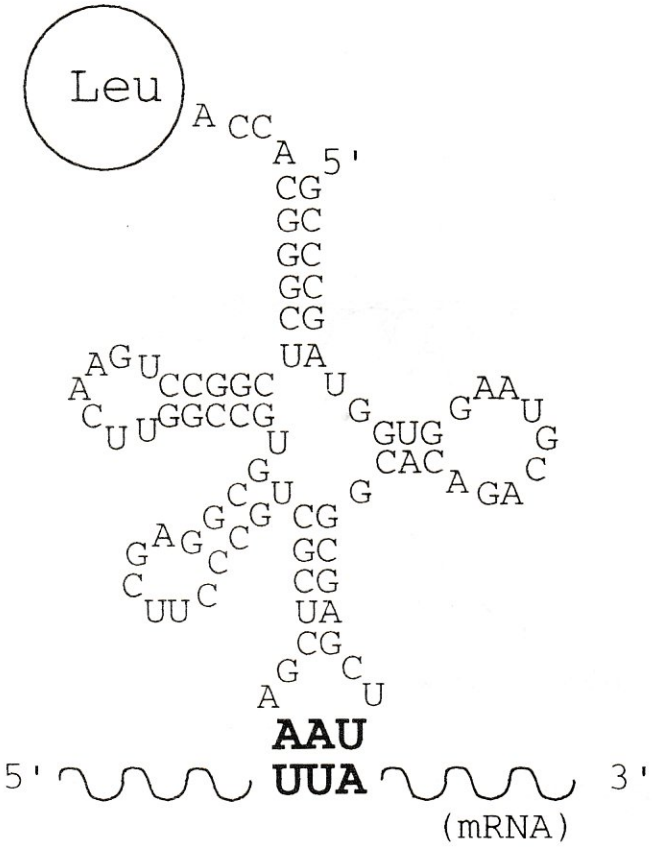


Figura 2. Estructura del tRNA codificado por el gen *bldA*, deducida a partir de la secuencia. Se muestra la posición en el extremo 3' del tRNA donde se une la leucina, así como el anticodón acoplado a un codón UUA en una molécula de RNA mensajero (mRNA).

Con base en las consideraciones hechas anteriormente sobre el uso de los codones en *Streptomyces,* podemos darnos cuenta que este es un codón muy poco utilizado en los genes de estos organismos, ya que aparte de él existen otros cinco codones para leucina; el codón UUA es el único de los seis que carece de G o C. El hecho de que el producto del gen *bldA* es efectivamente el único tRNA capaz de traducir codones UUA ha podido ser demostrado al analizar genes que no se expresan en mutantes *bldA* por contener uno o más codones UUA, ya que al sustituir éstos mediante mutagénesis dirigida por codones UUG (también para leucina) su expresión se vuelve normal en dichas cepas mutantes.

Resulta evidente que todos los genes cuya expresión es esencial para el crecimiento vegetativo carecen de codones UUA, puesto que las cepas que tienen mutaciones en el gen *bldA* son capaces de crecer normalmente durante la etapa vegetativa (en caso de que genes esenciales tuvieran codones UUA una mutación en el gen *bldA* sería letal). Es interesante, entonces, analizar cuáles son los genes en los que se han encontrado leucinas codificadas por el codón UUA. Se trata, en su mayoría, de genes que participan en la regulación de la biosíntesis de antibióticos, lo cual explica porqué las cepas con mutaciones en *bldA* son incapaces de producir antibióticos (4). Como un ejemplo baste citar el caso del antibiótico actinorrodina. Todos los genes (alrededor de 30) para la vía biosintética de este antibiótico han sido clonados y secuenciados.

Los estudios genéticos previos habían demostrado que bastaba con una sola mutación en un gen específico para eliminar la expresión de todos los genes de la vía biosintética. La secuenciación de esta región demostró que este gen codifica un activador transcripcional, el cual es necesario para que todos los demás genes, que codifican a las enzimas de la vía biosintética, puedan transcribirse. Es precisamente en el gen para este activador donde se encontró un codón UUA (Fig 3), de manera que en mutantes *bldA* no se podía sintetizar actinorrodina, al carecer estas cepas del tRNA específico que permite la traducción de la proteína activadora.

Al sustituir dicho codón UUA en el gen que codifica al activador por un codón UUG se sintetizó nuevamente la actinorrodina, pero curiosamente ésta no era exportada al medio. Lo anterior se debe a que la actinorrodina requiere de un sistema de transporte para ser secretada y en el gen que codifica para la proteína de exportación también existe un codón UUA. Al sustituir este segundo codón UUA por un codón UUG la actinorrodina se sintetizó y exportó normalmente en una cepa con una mutación en *bldA*, la cual, como era de esperarse, seguía siendo incapaz de diferenciarse morfológicamente. Lo anterior implica que aparte del gen para el activador y del gen para la proteína de exporta-

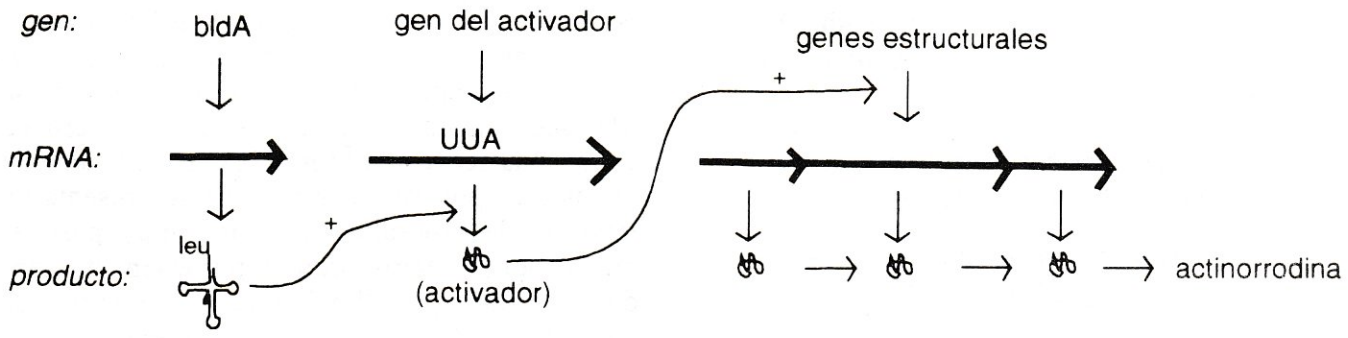


Figura 3. Regulación traduccional de la síntesis del antibiótico actinorrodina por el gen *bldA*. Se requiere la presencia del tRNA maduro y cargado para la *traducción* del mRNA del activador de los genes de actinorrodina, el cual a su vez se necesita para la *transcripción* de éstos. En una mutante *bldA* no habrá tRNA, por lo que el mRNA para el activador no se traducirá (aunque sí puede ser transcrito) y por lo tanto los genes de actinorrodina permanecerán apagados.

ción ningún otro gen de la vía biosintética de actinorrodina posee codones UUA. Es decir que el uso de codones UUA está restringido solamente a dos genes "claves" para la expresión de este antibiótico, en lugar de encontrarse en la mayoría de ellos (4,5).

El hecho de que los genes con codones UUA solamente se expresen durante la diferenciación quiere decir que de alguna manera se regula la síntesis del tRNA maduro. Esto podría ocurrir a nivel de la transcripción del gen *bldA*, del procesamiento del transcrito para dar un tRNA, de la modificación de bases específicas sólo encontradas en tRNAs o de su acoplamiento con leucina por medio de la leucil-tRNA sintetasa específica. Los experimentos recientes han demostrado que la expresión del gen *bldA* está regulada a nivel transcripcional, ya que los niveles del tRNA aumentan durante la transición de la etapa de crecimiento vegetativo a la etapa de formación del micelio aéreo; sin embargo esto no quiere decir que este sea el único mecanismo de regulación utilizado (4,6).

UN FACTOR SIGMA CONTROLA LA FORMACION DE ESPORAS

Actualmente se sabe que la mayoría de las eubacterias presentan heterogeneidad en su polimerasa de RNA. Esta heterogeneidad se debe a la utilización de factores sigma alternativos. Los factores sigma son proteínas que se asocian a la polimerasa únicamente para el inicio de la transcripción, ya que son responsables del reconocimiento específico de las secuencias promotoras de los genes. Se sabe que diferentes factores sigma son responsables del reconocimiento de distintas secuencias promotoras; de esta forma, la mayoría de las bacterias son capaces de regular funciones "idiosincráticas", que solamente se requieren en condiciones muy particulares, mediante el uso de promotores diferentes a los reconocidos por el factor sigma principal. De esta forma se pueden encender muchos genes que participan en una misma función mediante la síntesis del factor sigma que va a permitir su transcripción. La polimerasa de RNA en *Streptomyces* presenta una gran heterogeneidad en cuanto a la capacidad de utilizar factores sigma alternativos para el inicio de la transcripción (7).

Un ejemplo interesante del uso de factores sigma en *Streptomyces* lo constituye el factor sigma codificado por el gen *whiG*. Como se mencionó anteriormente las cepas con mutaciones en los genes *whi* son capaces de producir micelio aéreo, pero incapaces de transformarlo posteriormente a esporas maduras (1). En el caso de las mutaciones WhiG, éstas pueden ser complementadas cuando se les introduce por medio de un vector el gen *whiG*. El producto de este gen parece ser un factor sigma que es indispensable para que la polimerasa de RNA pueda iniciar la transcripción de genes necesarios para la

formación de esporas (8). Cuando el gen *whiG* es clonado en un vector de alto número de copias, el micelio sobreproduce factor sigma WhiG, y se presenta una esporulación aberrante: el

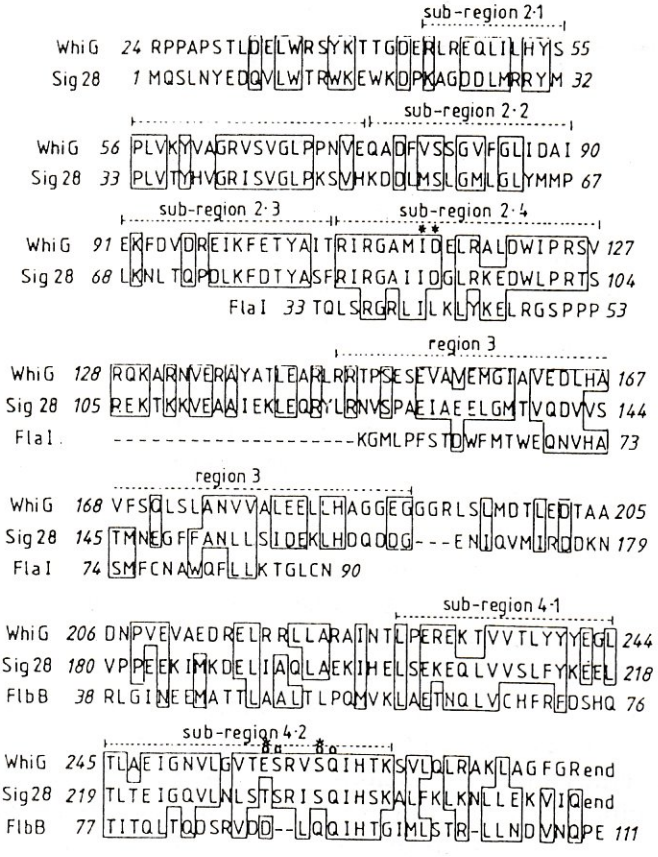


Figura 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del factor sigma WhiG con los factores sigma que intervienen en la motilidad de *B. subtilis* (Sig 28) y *E. coli* (FlaI-FlbB). Los asteriscos muestran aminoácidos que interactúan con las regiones promotoras (8).

exceso de este factor sigma ocasiona que se tenga una esporulación exagerada y a destiempo, inclusive sin la formación de micelio aéreo, formándose las esporas directamente sobre el micelio vegetativo (1, 9). Por otro lado, si se introduce en un vector de elevado número de copias una secuencia promotora específicamente reconocida por este factor sigma se presenta un fenotipo de esporulación escasa, muy posiblemente porque estos promotores estén "titulando" al factor sigma WhiG celular, lo que impide que éste quede libre en niveles suficientes para iniciar la transcripción de los genes participantes en la esporulación (sus blancos normales de acción). Los promotores transcritos por el factor sigma WhiG muestran similitud, a nivel de su secuencia de aminoácidos, con algunos promotores de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* los cuales, pertenecen a genes que tienen que ver con la motilidad (8,10). Como era de esperarse, el factor sigma WhiG también muestra similitud considerable con los factores sigma de *B. subtilis* y *E.coli* responsables de transcribir dichos promotores (Fig 4).

Actualmente, aparte del gen *bldA* y del gen *whiG* se han logrado clonar algunos otros genes que participan en la diferenciación de *Streptomyces*. Si la información que se obtenga de ellos resulta ser tan novedosa e interesante como la de los genes aquí descritos sin duda continuará siendo esta área una de las más interesantes dentro de la genética molecular bacteriana.

REFERENCIAS

1. Chater, K.F. (1989). Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. Trends Genet. *5*: 372-377.

2. Bibb, M.J., Findlay, P.R. y Johnson, M.W. (1984). The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use in the simple and reliable identification of protein coding sequences. Gene *30*: 157-166.

3. Lawlor, E.J., Baylis, H.A. y Chater, K.F. (1987). Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Genes Develop. *1*: 1305-1310.

4. Leskiw, B.K., Bibb, M.J. y Chater, K.F. (1991). The use of a rare codon specifically during development? Mol. Microbiol. *5*: 2861-2867.

5. Fernández-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A. y Malpartida, F. (1991). The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. Cell *66*: 769-780.

6. Leskiw, B.K., Mah, R., Lawlor, E.J., y Chater, K.F. (1993). Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol. *175*: 1995-2005.

7. Buttner, M.J. (1989). RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol. Microbiol. *3*: 1653-1659.

8. Chater, K.F., Bruton, C.J., Plaskitt, K.A., Buttner, M.J., Méndez, C. y Helmann, J.D. (1989). The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends crucially on a gene product homologous with the motility sigma factor of *B. subtilis*. Cell *59*: 133-143.

9. Méndez, C. y Chater, K.F. (1987). Cloning of *whiG*, a gene critical for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol. *169*: 5715-5720.

10. Tan, H. y Chater, K.F. (1993). Two developmentally controlled promoters of *Streptomyces coelicolor* A3(2) that resemble the major class of motility-related promoters in other bacteria. J. Bacteriol. *175*: 933-940.

DEL BUEN DECIR... (4)

1. AMORTIGUADOR. Solución capaz de resistir o amortiguar cambios sustanciales del pH. Usese en lugar de "buffer".

2. ARTIFICIO. Del latín *artificium* (de *ars*, arte y *facere*, hacer). Indica, entre otras acepciones, destreza, habilidad, estratagema, engaño, astucia. Cuando la empleamos en biología o bioquímica indica algo que no existe en la naturaleza (artificio de técnica). Se usa incorrectamente "artefacto" (obra "mecánica" por influencia del inglés *artifact* que tiene las dos acepciones (a pesar de que existe el vocablo *artifice*, poco usado).

3. ELUIR. Del latín *elutus*, participio pasado de *eluere* (lavar, limpiar, extraer, disolver). Proponemos este neologismo para significar el proceso de desprender de una columna de cromatografía u otro medio, una sustancia adsorbida, utilizando un disolvente. Derivados: elución, eluyente, eluído (no "eluado" ni "eluato").

4. GAMA, ESPECTRO, EXTENSION, SERIE, INTERVALO, ALCANCE, ETC. Todas estas palabras traducen correctamente, según el caso, a *range* (del francés antiguo rang, y éste del germánico hring, círculo). "Rango" significa clase, categoría, calidad, situación social o posición militar. Con un dejo de ironía, el Dr. Silvestre Frenk nos dice que si range se traduce como "rango", change se debería traducir como "chango"... Ejemplos tomados de la literatura nacional: "with ranges from 74 to 89...", traducido: con "rangos" de edad de 74 a 89... (debió decirse: en el intervalo de 74 a 89 años de edad). En otro caso, "with a range from three to thirteen" fue traducido correctamente como "con límites de tres a trece años".

5. INTERCONECTAR. Formar uniones covalentes entre cadenas de moléculas poliméricas. Es preferible traducir así: to cross-link en lugar de "croslinquear".

Nota: Aparecerá siempre en primer lugar el uso correcto de una palabra en mayúsculas y el uso incorrecto actual entrecomillado. La correspondencia puede ser dirigida a: COMISION DE DEFENSA DEL LENGUAJE BIOQUIMICO

Alberto Huberman Wajsman
Instituto Nacional de la Nutrición
"Salvador Zubirán"

RECONOCIMIENTO AL DR JESUS GUZMAN

Escribir una nota para conmemorar que nuestro querido maestro el Dr Guzmán haya sido nombrado Profesor Emérito de nuestra Universidad el pasado diciembre, nos produce una gran alegría a todos los que directamente estuvimos y aprendimos de él química, bioquímica, matemáticas, principios científicos fundamentales, pasión y entusiasmo por el trabajo, todo lo cual dio origen a una firme y duradera amistad.

Es indudable que para el desarrollo de la bioquímica y la investigación bioquímica, el Dr. Jesús Guzmán ha representado y sigue representando un punto de apoyo sin el cual el camino recorrido hubiera sido más difícil. Para los que tuvimos la oportunidad de interaccionar directamente con él, podría parecernos natural su actitud constante de apoyo a la docencia y a la investigación; sin embargo, creemos que su labor no debe de pasar desapercibida y que es preciso que trascienda para estar conscientes que el caminar en la Ciencia no se da espontáneamente y que se requiere de maestros de la estatura del Maestro Guzmán, que allanan los caminos y fortalecen las esperanzas. Esta actitud de apoyo la ha mantenido a lo largo de las distintas actividades académicas y administrativas que le han sido encomendadas, de allí que pensamos que es algo que está fuertemente unido a su personalidad.

El Dr. Guzmán posee una sólida formación académica que se inició con los estudios de licenciatura en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, la maestría en la Universidad de Wisconsin y de doctorado en la primera institución, realizando una estancia posdoctoral en la Universidad de Minnesota.

Su labor docente ha sido brillante, se inicia en su institución de origen y se desarrolla y consolida en la Universidad Nacional Autónoma de México, en la que destaca su gran interés en la formación académica de los jóvenes tanto a nivel de pregrado como de posgrado. Este interés se manifiesta no sólo a través de las cátedras que imparte, sino en la innovación y actualización de programas de enseñanza de la Bioquímcia.

Durante toda su permanencia en nuestra Universidad, su verdadera vocación de Maestro lo llevó en repetidas ocasiones, a pasar largas horas tratando de enseñar bioquímica a los reprobados en la Escuela de Medicina, rescatando a muchos a fuerza de argumentos y contraargumentos, buscando tenazmente traducir a palabras o gráficamente los difíciles conceptos de la bioquímica básica, sin escatimar tiempo ni esfuerzo.

Su interés en la docencia, aunado a sus cualidades organizativas, permitieron con posterioridad su designación como Director de la ENEP Cuautitlán, durante una etapa de gran trascendencia para la Universidad como fue la de la descentralización de los Centros de Enseñanza y la creación de las Escuelas Nacionales de Enseñanza Profesional.

Recordamos con cariño su participación en el inicio de la investigación básica en el país durante su estancia en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en los que se hizo patente su colaboración en las difíciles lides de nuestra incipiente formación como investigadores, y su paciencia para explicarnos en las aulas, en los laboratorios, en el trayecto a la casa, en los pasillos, en las reuniones, antes y después de los exámenes, incansable, como un verdadero "tutor" científico de tiempo completo. Siempre presente para cualquier sugerencia, tratando de resolver los problemas académicos, económicos o personales y tomando parte entusiasta en seminarios de investigación o de bibliografía.

Posiblemente ésta fue una experiencia muy profunda en el Maestro Guzmán, de tal manera que cuando fue llamado a ocupar puestos acadé-

mico-administrativos, que lamentablemente lo alejaron de los experimentos en los que sin duda era feliz, aprovechó su conocimiento profundo de la problemática de la investigación en nuestro país y en la universidad, de tal manera que siempre estuvo dispuesto a ayudar a la comunidad científica en todas su apremiantes necesidades con la misma pasión y entrega como si se tratara de su propio trabajo. Su desempeño en el terreno de la difusión de la ciencia se refleja en su participación en la fundación de la Sociedad Mexicana de Bioquímica y su afiliación a numerosas organizaciones científicas, a través de las cuales fue un entusiasta organizador de Coloquios, Congresos, Seminarios o cualquier otro medio de intercambio de conocimientos científicos.

Creemos que todo esto enfatiza la trayectoria de un universitario cabal, que ya sea en la investigación científica o la enseñanza, ha merecido el título de "***Maestro***".

Marietta Tuena y Victoria Chagoya
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México

RECORDANDO A LA DOCTORA AURORA BRUNNER LIEBSHARD

—Oiga Dr Escamilla (profesor de la materia) como que esto de la bioquímica nos gusta, por lo que quisiéramos ver la posibilidad de hacer investigación en el Departamento.

—Dr Piña (jefe del Departamento), le presento a estos dos alumnos despistados de mi grupo que dicen disque estar interesados en realizar labores de investigación.

—A ver güera (Dra Aurora Brunner L) estos dos muchachos quieren hacer investigación. ¿Qué te parece si te ayudan?

—Bien, mañana regresen y platicamos del proyecto.

Así de sencillo y en menos de media hora Esteban Celis y yo fuimos presentados a la Dra Aurora Brunner al finalizar el curso de bioquímica en el año de 1971.

Al día siguiente de este encuentro iniciamos lo que sería una gran y especial amistad con la Dra Brunner, así como nuestra incursión al mundo de la bioquímica bajo su tutela con el trabajo pionero de genética mitocondrial relacionada con la búsqueda de mutantes resistentes a antibióticos y drogas que interfieren con el DNA mitocondrial de la levadura *Kluyveromyces lactis.*

Muchos fueron los logros académicos de la Dra Brunner; sin embargo, algo que no se encuentra plasmado en papel y que quedara manifiesto en todos sus alumnos, amigos y compañeros es la enorme huella que dejó su calidez humana y su enorme sentido de lo que debe entenderse por compañerismo. Si bien, este sentimiento es generalizado para los que tuvimos la verdadera suerte de poder trabajar con la güera Brunner, el gran vacío que deja en nuestra comunidad sólo ha sido posible superarlo con el sentimiento de enorme gratitud por habernos enseñado y guiado durante esos importantes primeros años. La figura y filosofía de la Dra Brunner continuará entre nosotros al seguir sus pupilos, amigos y compañeros su gran ejemplo en la búsqueda de la verdad y la excelencia.

Breve biografía de la Dra Aurora Brunner Liebshard

Aurora brunner Liebshard nació en la ciudad de México en 1939, estudió la Primaria y la Secundaria en el Colegio Gordon y la Preparatoria en la Universidad Femenina de México.

Obtuvo el título de Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México con la tesis "Aislamiento y Caracterización de los Hidrocarburos de la Cera Natural del Henequén". Estudió el Doctorado en Bioquímica, en la misma Facultad y recibió el grado de Doctor en diciembre de 1972 con la tesis "Purificación y Propiedades de la D-Glucosa-6-Fosfato, L-mio-Inositol- 1- Fosfato Cicloaldolasa de *Neurospora crassa*".

Su investigación versó sobre dos áreas: durante su posgrado trabajó en enzimología, sobre las propiedades de la transaminasa glutámico oxaloacética de rata y de pollo y la purificación y regulación de la flucocicloaldolasa de *Neurospora crassa* y la treonina desaminasa de una mutante de levadura. En 1971 orientó su trabajo hacia la genética mitocondrial, en la búsqueda de mutantes resistentes a antibióticos y drogas que interfieren con las funciones de la mitocondria en *Kluyveromyces lactis*. Fue pionera en México en la investigación y la docencia de la genética y la biología molecular. Obtuvo becas de diversas instituciones, entre ellas, el Instituto Mexicano de Investigaciones Tecnológicas, la Coordinación de la Investigación Científica, la Embajada de Francia, el Consejo Británico, el Gobierno de Estados Unidos y la Comunidad Económica Europea.

Sus investigaciones las llevó a cabo en México en el Instituto Mexicano de Investigaciones Tecnológicas, A C; en el Depto de Bioquímica del Hospital de Enfermedades de la Nutrición; en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en el Centro de Investigación en Fisiología Celular y en el Instituto de Fisiología Celular. Hizo estancias con la Robichon- Szulmajster, en Gif-sur-Yvette, Francia; en John Hopkins University, E.U.A. con James Mattoon; en el Department of Molecular Biology, Universidad de Warwick, Inglaterra, con David E. Griffiths; en el Department of Biochemistry, Division of Molecular Biology del Health Science Center en Dallas, Texas, con Nancy C. Martin, y con A Tzagoloff de la Universidad de Columbia en Nueva York y en el Institut Curie con el Profesor Hiroshi Fukahara.

Parte importante de su trabajo consistió en participar en la formación de recursos humanos, en especial de algunos que son actualmente investigadores independientes. Dirigió 16 tesis de licenciatura, dos de maestría y una de doctorado. Fue Jefe del Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y colaboró en la organización de varias reuniones científicas.

La Dra Brunner falleció en la Ciudad de México, el día 18 de agosto de 1993.

Jaime Mas Oliva
Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Medicina.
Instituto de Fisiología Celular de la
Universidad Nacional Autónoma de México.

ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA, AC

III CONGRESO

Por este conducto se invita a todos los profesores de bioquímica o ciencias afines, a presentar el producto de su trabajo académico en el área docente, en el III Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica AC, que se realizará los dias 28, 29 y 30 de agosto de 1994, en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia, Mich., durante la SEGUNDA SEMANA DE EDUCACION BIOQUIMICA.

Como ha sido avisado con anterioridad el tema central del congreso es EVALUACION DE LA EXPERIENCIA DOCENTE, mismo que se ha subdividido en varias áreas:

1. Planes y programas de estudio
2. Proceso enseñanza-aprendizaje
3. Métodos educativos
4. Comparación de aprendizaje entre varias disciplinas
5. Prácticas
6. Perspectivas
7. Otros

Para la presentación de su resumen se le pide lo realice dentro del recuadro que se anexa; sin rebasar los márgenes; utilizando máquina eléctrica o computadora con letra tipo Courier 12. El título deberá ir a mayúsculas en el rectángulo superior; en el siguiente deberá ir el o los nombres de los autores, institución, ciudad y país a mayúsculas y minúsculas y en el rectángulo inferior el resúmen. Le pedimos cuidar su presentación y ortografía, pues de lo contrario no se podrá incluir en las memorias que se elaborarán en ocasión del congreso. El original de su trabajo no deberá tener borrones ni tachaduras y se enviará sin doblar junto con tres copias a nombre de:

Ricardo Santiago Díaz.
Secretario-Tesorero
Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC
Apdo Postal 70-281
Coyoacán, 04510
México, D F.

o de: Yolanda Saldaña Balmori Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, UNAM Teléfono: 623-21-68

La fecha límite para la entrega de los resúmenes será el **15 de junio** del presente.

Las cuotas de inscripción al congreso son de N$200.00, para los socios e incluye la renovación de su membresía por el año de 1994, su participación en el congreso y la suscripción del Boletín de Educación Bioquímica por el año, y para los no socios es de N$250.00 e incluye su participación en el congreso y la suscripción del Boletín de Educación Bioquímica por el año de 1994. Su pago deberá realizarse con un depósito en la **cuenta No. 1153813-9 de Bancomer** y enviarnos al fax número 525-616-2419 (si su depósito es del interior del país y omita los tres primeros números si su envío es de la Ciudad de México), o junto con su resumen una copia de este documento y conservar su comprobante bancario para posibles futuras aclaraciones.

Si su pago lo realiza después del 15 de junio, el costo es de N$250.00 para los socios y de N300.00 para los no socios.

Para la mejor organización del congreso le pedimos nos proporcione los siguientes datos:

A. Forma en la que desee hacer su presentación: Oral ( ), Cartel ( ), Indistinto ( ).

B. Area de su trabajo: 1 ( ), 2 ( ), 3 ( ), 4( ), 5 ( ), 6 ( ), 7 ( ).

C. Compromiso docente: Titular ( ), Adjunto ( ), Instructor de prácticas ( ), Otro ( ) ¿Cuál?_____

D. Es miembro de la Asociación: Si ( ), No ( ).

E. Datos personales:

Nombre _____

Domicilio_____

Ciudad_____ Estado _____ País _____

Teléfono_____ Fax _____

Institución _____

XXI TALLER DE ACTUALIZACION BIOQUIMICA

A 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 **XXI Taller de Actualización Bioquímica**, que se realizará del 31 de agosto al 2 de septiembre de 1994, en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia, Mich.

Para mayores informes dirigirse a los miembros del Comité Organizador: Dres. Federico Martínez M. y Sara Morales López, al Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. FAX 616-24-19 y al Apdo. Postal 70-159, C.P. 04510 y en Morelia, Mich, con el Dr Alfredo Saavedra Molina al teléfeno 91(43) 26-57-90, y Fax 91(43) 26-57-88.

Este taller, junto con el Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., constituyen la "2a SEMANA DE LA EDUCACION BIOQUIMICA" y se realizarán en forma consecutiva.

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 en idioma español y un abstract en inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.

3) Se sugiere un máximo de quince 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, Pearlmutter, 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 bien a través del corresponsal del BEB en su localidad.