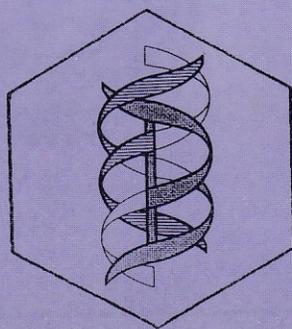


BEB 96

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA



Organo de información de la
**ASOCIACION MEXICANA DE
PROFESORES DE BIOQUIMICA, A C**

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIODICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias).

COMITE EDITORIAL

EDITORES FUNDADORES

ENRIQUE PIÑA GARZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

EDITORES

JOSE VICTOR CALDERON SALINAS

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

EDMUNDO CHAVEZ COSIO

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

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

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Instituto de Fisiología Celular
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

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR ASOCIADO

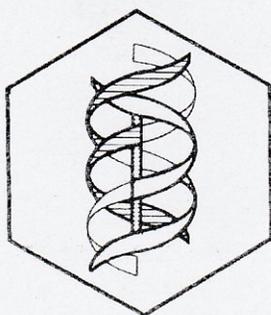
MA TERESA ELIZABETH FLORES RODRIGUEZ

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

APOYO SECRETARIAL

ELISA MORA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México



Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, AC



Facultad de Medicina,
UNAM

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. Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIODICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Corregio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,500 ejemplares.

EDITORIAL

HACIA EL QUINTO CONGRESO DE LA ASOCIACION

Como resultado de la evaluación que, del IV Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C, se hizo en el editorial de Diciembre de 1995, el Consejo Directivo de nuestra Asociación llevó a cabo una junta extraordinaria, el 24 de Enero de 1996, en la que se empezaron a dar los pasos necesarios para llegar al V Congreso. En esta reunión se decidió conformar un Comité que se encargue de organizar dicho acontecimiento, el que se integró con José Victor Calderón Salinas, Alejandro Zentella Dehesa y Jesús Manuel León Cázares. Del trabajo de este comité, se deriva la convocatoria que se publica en el presente número, de la que sobresale el proceso de revisión de los resúmenes, que hace posible que los autores puedan corregirlos, antes de su aceptación definitiva; así como la mayor extensión de los mismos, con la finalidad de obtener un documento de consulta y la propuesta de que las memorias se publiquen como parte del número correspondiente a Septiembre de 1996 y estén disponibles para los asistentes desde el momento de la inscripción. También resulta interesante la redefinición de las áreas en las cuales se pueden ubicar los trabajos libres, las que cubren los

aspectos más relevantes del proceso de enseñanza-aprendizaje. Debido a lo detallado de los requisitos para el recibo de los trabajos, de las indicaciones para la elaboración del resumen y de la forma en que se llevarán a cabo los tipos de presentación de las ponencias, se espera que tanto el proceso de revisión como de aceptación de los trabajos será eficiente, lo que permitirá contar con toda oportunidad con los materiales para la elaboración de las memorias correspondientes. Además, se espera que el desarrollo del Congreso, como se planteó en el Editorial de referencia: "llegará a los niveles adecuados de organización, participación y resultados que un esfuerzo de este tipo deben generar como justa retribución a los organizadores, los ponentes y el auditorio", sin embargo es necesario enfatizar que para que todo esto ocurra, no es suficiente con la labor de los organizadores o con un buen trabajo editorial, sino que será la entusiasta y formal participación de ustedes, tanto como ponentes como en su papel de auditorio, el factor crucial para el éxito de la reunión.

El Consejo Directivo

EL CICLO CELULAR Y SU REGULACION: LA INTERACCION ENTRE LAS PROTEINAS CINASAS CDKs Y LA FAMILIA DE LAS CICLINAS

Alejandro Zentella Dehesa, Rebeca López Marure, Erika Gómez González, Rafael E Paredes García, María de Jesús Ibarra Sánchez. Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-243, México 04510, DF, México.

Recibido: Agosto 22 de 1995. Aceptado: Enero 30 de 1996.
Bol Educ Bioq (México) XV(1):4-12

"El ciclo celular es una serie ordenada de procesos que permite a las células crecer, duplicar su material genético, segregarse en dos juegos de material duplicado y dividirse para dar origen a dos células hijas." Murray A y Hunt T, 1993 (1)

RESUMEN

La importancia del ciclo celular radica en que este proceso está ligado a la definición misma de la Teoría Celular, ya que constituye el mecanismo por el cual las células, y por ende los organismos vivos, pueden dar origen a células con sus mismas características. Los estudios en las áreas de biología celular, genética, biología del desarrollo, bioquímica y biología molecular, han contribuido a identificar que la maquinaria que controla el ciclo está constituida por dos grupos de proteínas nucleares: la familia de las CDKs, un grupo de proteínas cinasas que fosforilan residuos de serina y treonina, y la familia de las ciclinas que se unen a las CDKs, lo que resulta en la activación. Esta revisión presenta una breve reseña histórica de la caracterización de MPF y p34^{cdc2}, los primeros miembros de esta familia de proteínas cinasas que fueron identificados. En la última parte se presenta un modelo de nuestro conocimiento actual de la regulación bioquímica de estas proteínas cinasas.

PALABRAS CLAVE: Proteínas cinasas dependiente de ciclinas, seril-treonil proteínas cinasas, ciclina, CDK2, cdc2, KIP.

ABSTRACT

The relevance of the cell cycle consists in the fact that this process is linked to the definition of the

cellular theory, since it represents the mechanism by which cells, and hence living organisms, give rise to cells with their same characteristics. Studies in the fields of cell biology, genetics, developmental biology, biochemistry and molecular biology have identified that the machinery that controls the cell cycle is constituted by two groups of nuclear proteins: the family of CDKs, a group of seril-treonil-protein kinases and the family of cyclin that binds to them resulting in enzyme activity. This review presents a brief historical description of the characterization of MPF and p34^{cdc2}, the first members of this family of protein kinases identified, and concentrates on the manner in which they are regulated. We end by discussing our present knowledge of the biochemical regulation of this protein kinases.

KEY WORDS: Cyclin dependent protein kinases, seril-treonil-protein kinases, cyclin, CDK2, cdc2, KIP.

ABREVIATURAS: cdc: del inglés "cell division cycle"; CDK: del inglés "cyclin dependent kinase"; MPF: originalmente del inglés "maturation promoting factor", ahora "M-phase promoting factor"; CLN: del inglés "cyclin"; p34: monómero inactivo de la proteína cinasa con una masa de 34 kDa; KIP: del inglés "kinase inhibitory proteins"; cdc: del inglés "cell division cycle mutants"; CDKs: del inglés "cyclin dependent kinases". Las abreviaturas en minúscula y cursiva se refieren a los genes, como *cdc2*, mientras que aquellas en mayúscula se refieren a las proteínas, como CDC2.

INTRODUCCION

El ciclo celular es un fenómeno común a todas las células, del cual existen variaciones entre las que

sobresalen la mitosis y la meiosis. La principal diferencia entre estos 2 procesos radica en la carga genética de las células que resultan, ya que los fenómenos celulares que se pueden observar son muy similares en ambos casos. En organismos multicelulares la mitosis es responsable del crecimiento, por aumento en el número de células somáticas que contienen la misma carga genética, mientras que la meiosis participa en la reproducción sexual al dar origen a los gametos que contienen la mitad de la carga genética. En su versión mitótica el ciclo celular está dividido en cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M, y una fase fuera del ciclo denominada G_0 . La figura 1 representa las distintas fases de un ciclo mitótico y resalta los principales puntos de regulación.

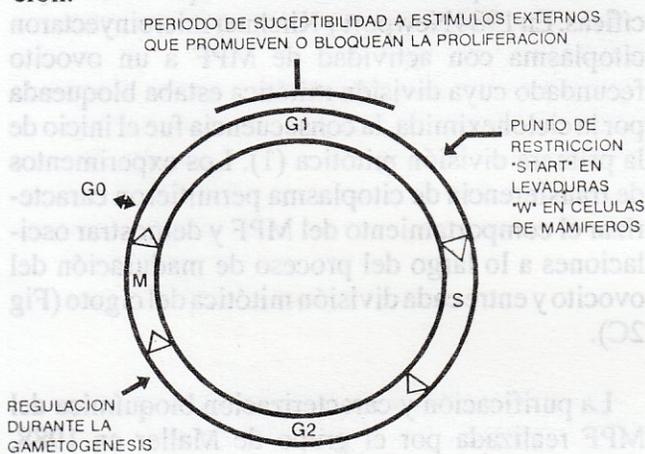


Figura 1. Fases del ciclo celular y los principales puntos de regulación identificados en levaduras y mamíferos.

Sólo durante G_1 las células son susceptibles a estímulos que activan o bloquean la proliferación celular que determinan si la célula se divide o no. Una vez que la célula ha sido estimulada pasa un punto crítico de la fase G_1 denominado punto de restricción o "W" en células de mamífero y punto de arranque o "start" en levaduras. Una vez que este punto ha sido sobrepasado el ciclo no puede detenerse y la célula entra a la fase S durante la cual se duplica el material genético. Una vez terminada la duplicación del genoma se inicia la fase G_2 durante la cual la célula aumenta de tamaño y multiplica sus orgánulos en preparación a la división celular. Finalmente se inicia la mitosis o fase M durante la cual se condensan dos juegos de cromosomas y un complemento cromosómico se segrega en cada una de las células hijas, mientras que la célula se divide. En ocasiones cuando no hay estímulos mitogénicos o se presenta

un bloqueo como la inhibición por contacto, se entra a un estado denominado G_0 . Hay muchas variantes de la mitosis: citocinesis, como en mamíferos; gemación, como en levaduras, y septación como en plantas. Es importante notar que si bien existen diversos puntos de control en los límites de cada una de las fases, el punto de regulación que define si una célula se divide o no, es el que determina el paso de G_1 a S, si una célula no puede completar el ciclo este impedimento la lleva a la muerte. Todo esto sugiere que en este punto de restricción ocurren procesos bioquímicos de naturaleza irreversible que comprometen a la célula a completar el ciclo.

Ya que la descripción de los fenómenos celulares característicos de las fases del ciclo celular y en particular de la mitosis se encuentra fuera del propósito de este trabajo se recomiendan excelentes revisiones en libros de texto (2, 3, 4 y 5).

EL FACTOR PROMOTOR DE LA MADURACION (MPF) Y LA BUSQUEDA DE UN REGULADOR BIOQUIMICO DEL CICLO CELULAR

La primera evidencia de un mecanismo bioquímico de la regulación del ciclo celular se obtuvo mediante el estudio de la ovogénesis de los anfibios (1 y 2) (Fig 2A).

En estos organismos los ovocitos crecen hasta alcanzar 1 mm de diámetro y almacenan nutrientes para mantener las primeras divisiones del desarrollo embrionario. Estas enormes células, casi visibles a simple vista, son fáciles de observar y manipular bajo un microscopio, lo que hace de ellas un modelo útil en experimentos de microinyección. Al finalizar su crecimiento los ovocitos son aún diploides y por medio de un proceso denominado maduración meiótica dan origen a los ovocitos maduros (células haploides). En ranas la entrada a esta división meiótica se induce por la progesterona, que en respuesta a un estímulo externo es secretada por las células que rodean a los ovocitos. La progesterona activa a los ovocitos que inician la meiosis pasando por la primera y la segunda divisiones meióticas y se detienen en la metafase de la segunda división meiótica (Fig 2A). Al ocurrir la fecundación el bloqueo de la metafase desaparece y se inicia la primera división mitótica del cigoto. El estudio bioquímico de los mecanismos de regulación del ciclo celular se inició al postular que el tratamiento con progesterona induce la aparición

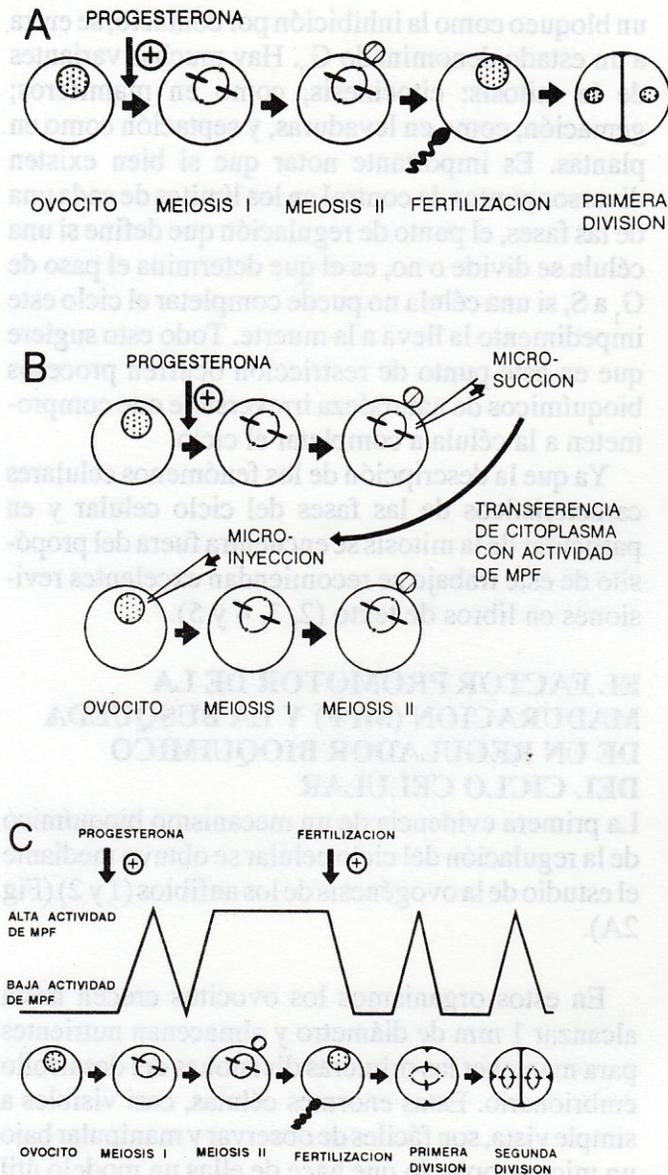


Figura 2. Experimentos de transferencia de citoplasma que demostraron la existencia del MPF. A) Proceso normal de maduración y fecundación de los ovocitos de rana. B) Activación de ovocitos inactivos por transferencia de citoplasma de ovocitos activados con progesterona. C) Actividad de MPF durante la maduración y fertilización de los ovocitos evaluada por transferencia de citoplasma. Modificada de la referencia 1.

de un factor bioquímico presente en el citoplasma del ovocito activado y que este factor es capaz de iniciar un ciclo meiótico. En 1971 Masui y Markeret obtuvieron evidencia experimental que apoyaba esta hipótesis al microinyectar citoplasma de ovocitos activados por progesterona a ovocitos inactivos, el resultado fue el inicio de la maduración meiótica en la célula microinyectada, como se muestra en la figura 2B. Esta actividad presente en el citoplasma

de una célula activada artificialmente por microinyección, podía a su vez ser transferida a un segundo ovocito y promover la maduración meiótica; este principio activo fue bautizado con el nombre de factor promotor de la maduración (MPF).

Los experimentos de Masui y Markeret mostraron que el MPF puede inducir la meiosis, pero un hallazgo inesperado demostró que el citoplasma con actividad de MPF puede inducir las primeras fases de una división mitótica. Normalmente la fecundación de un ovocito inicia la primera división mitótica, pero este proceso puede ser bloqueado por la adición de inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida, lo que sugería que para iniciar la mitosis se requiere de la síntesis de proteínas específicas. En 1984 Newport y Kirshner microinyectaron citoplasma con actividad de MPF a un ovocito fecundado cuya división mitótica estaba bloqueada por la cicloheximida, la consecuencia fue el inicio de la primera división mitótica (1). Los experimentos de transferencia de citoplasma permitieron caracterizar el comportamiento del MPF y demostrar oscilaciones a lo largo del proceso de maduración del ovocito y entre cada división mitótica del cigoto (Fig 2C).

La purificación y caracterización bioquímica del MPF realizada por el grupo de Maller en 1988, mostró que se trata de un complejo proteico que contiene al menos dos tipos de subunidades de 34 (p34) y 62 (p62) kDa respectivamente (1). La subunidad catalítica corresponde a p34 que posee actividad de proteína cinasa capaz de fosforilar residuos de serina y treonina. La subunidad reguladora p62 se encuentra asociada a p34. Estas subunidades reguladoras de la seril-treonil cinasa resultaron pertenecientes a una familia de proteínas nucleares, que se sintetizan y degradan en distintas fases del ciclo y que se agrupan bajo el término de ciclinas.

La caracterización funcional y bioquímica del MPF demostró que el paso de una fase a otra está controlado por un complejo proteico. Por una parte permite la transición de M a G₁, como en el caso de la maduración meiótica y por otra hace posible la transición de G₁ a S, como en el caso del ovocito recién fecundado. El hecho de que el mismo MPF pudiera estimular acontecimientos mitóticos y meióticos hacía pensar en un mecanismo común de

regulación. Aún faltaba determinar si este complejo participaba en otras fases del ciclo celular y si existían otros elementos que regulan la actividad de esta proteína cinasa.

LOS GENES *cdc2* y *cdc28* DE LEVADURAS CODIFICAN PARA PROTEINAS CINASAS HOMOLOGAS A LA PROTEINA CINASA p34 IDENTIFICADA EN VERTEBRADOS

El conocimiento de la naturaleza bioquímica del MPF fue un avance importante, pero el impulso definitivo en el entendimiento de la regulación del ciclo celular vino de estudios de genética realizados en levaduras (1, 2, 6 y 7).

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (levaduras que se dividen por gemación) y *Schizosaccharomyces pombe* (levaduras que se dividen por septación) resultaron ser modelos muy útiles en la identificación de genes relevantes que participan en la regulación del ciclo celular de las células eucarióticas (7). Por una parte este modelo se asemeja más a la división mitótica, característica de las células somáticas de un organismo multicelular, por otra, permite mutar genes de manera azarosa para después recuperar y caracterizar aquellas células que no pueden realizar o no pueden completar el proceso. Gracias a que las levaduras pueden ser mantenidas en un estado haploide y conjugarse bajo condiciones controladas, es posible realizar estudios genéticos de complementación, lo que permite establecer cuáles genes actúan antes que otros, aún sin saber qué clase de proteínas están codificadas por estos genes. Los estudios iniciales produjeron una lista de 32 genes cuya función está asociada al ciclo celular, hoy en día se sabe de más de 50 genes que participan en la regulación del ciclo celular. Se piensa que los productos de algunos de estos genes interaccionan con p34^{cdc2}, otros son sus reguladores y otros más sus sustratos. La mutación de estos genes hace que una célula sea incapaz de completar su ciclo celular o si lo hace esto es de manera anormal, por lo que estos genes recibieron el nombre de cdc. La figura 3 resume los principales genes, identificados en levaduras, que participan en la transición de G₁ a S.

El gen *cdc28* de *Saccharomyces cerevisiae* fue identificado desde un principio como un elemento central en la regulación del ciclo celular, ya que las

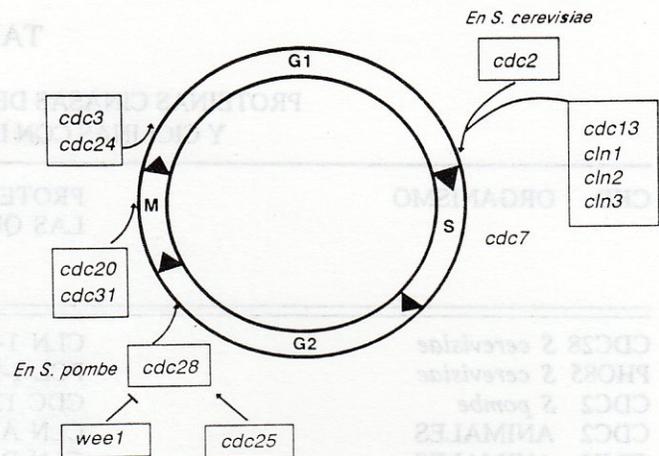


Figura 3. Genes que participan en el control del ciclo celular de levaduras. El gen *cdc25* activa a las cinasas codificadas por *cdc2* y *cdc28*; el gen *wee1* inhibe estas actividades. Adaptada de 1 y 7.

mutaciones que interfieren con su función interrumpen cualquiera de los procesos asociados al ciclo celular: gemación, duplicación (síntesis de ADN), formación de centriolos y husos acromáticos. Además de los productos del gen *cdc28* otros genes como *cdc24*, *cdc7* y *cdc31* son necesarios en distintas partes del ciclo, así por ejemplo, una mutación en el gen *cdc31* no permite la formación de centriolos y husos acromáticos pero aún puede haber duplicación, gemación y cariocinesis (1 y 7). Las células que portan una mutación en *cdc31* tienen una segregación cromosómica defectuosa y dan origen a células que no son viables. Este tipo de estudios pusieron de manifiesto que *cdc28* codifica para un elemento central de la maquinaria que regula el ciclo celular. Los estudios posteriores demostraron que *cdc28* tiene un homólogo en *Schizosaccharomyces pombe* denominado *cdc2* y cuando ambos genes fueron clonados y secuenciados resultaron pertenecer a la familia de proteínas cinasas que fosforilan residuos de serina y treonina (Tabla I).

Por medio de anticuerpos específicos contra las proteínas codificadas por *cdc2* y *cdc28*, quedó de manifiesto que éstas son homólogas de la proteína p34, identificada durante el aislamiento del MPF de ovocitos de rana (8); para unificar estas nomenclaturas y reflejar que la subunidad catalítica en vertebrados y levaduras es la misma, la proteína recibe el nombre conjunto de p34^{cdc2}. La Tabla I muestra las cinasas identificadas en mamíferos y su homología con las cinasas de levaduras (8). Al alinear las secuencias de todas estas cinasas se

TABLA I
 PROTEINAS CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS
 Y CICLINAS CON LAS QUE SE ASOCIAN

CKD	ORGANISMO	PROTEINAS CON LAS QUE SE ASOCIA	FASES DEL CICLO EN LAS QUE SE ENCUENTRAN
CDC28	<i>S cerevisiae</i>	CLN 1-3 y CLB 1-6	G ₁ /S/G ₂ /M
PHO85	<i>S cerevisiae</i>	PCL 1-2 y PHO 80	INICIO
CDC2	<i>S pombe</i>	CDC 13 y CIG 1-2	G ₁ /S/G ₂ /M
CDC2	ANIMALES	CLN A, CLN B	G ₂ y M
CDK2	ANIMALES	CLN D, CLN E, CLN A	G ₁ y S
CDK3	ANIMALES	?	?
CDK4	ANIMALES	CLN D	G ₁
CDK5	ANIMALES	CLN D, p53	G ₁
CDK6	ANIMALES	CLN D	G ₁
CDK7	ANIMALES	CLN H	G ₁ /S/G ₂ /M

La proteína cinasa PHO85 pertenece a la familia de proteínas cinasas dependientes de ciclinas pero su expresión está asociada al metabolismo del fósforo. La proteína p53 puede retener a las células en G₁ y su actividad está asociada a la reparación del ADN. Modificada de la referencia 8.

identificó una secuencia consenso de aminoácidos a la que se le denomina "PSTAIR", que se presenta con distintas variaciones. La secuencia consenso EGVPTAIRISLLKE está presente en todos los miembros de esta familia y se encuentra en una posición homóloga, está localizada en una alfa hélice del extremo amino terminal. Las mutaciones en esta secuencia acaban con la actividad enzimática e interfieren con la capacidad de formar un complejo activo con las ciclinas (1).

Además del gen *p34^{cdc2}* tres genes más, identificados en levaduras, *cdc25*, *wee1* y *mik1* (7), resultaron ser de interés ya que modulan la actividad de *p34^{cdc2}* y por ende el ciclo (Fig 3). Los productos de los genes *wee1* y *cdc25* mostraron ser una proteína cinasa que fosforila residuos de tirosina y de una fosfatasa respectivamente (1). Los estudios de complementación ya habían demostrado que el producto de *wee1* interrumpe el ciclo celular y sugirieron que la fosforilación de una tirosina de *p34^{cdc2}* interfiere con su función. En contraposición el producto codificado por *cdc25* tiene un efecto positivo sobre la actividad de *p34^{cdc2}*, lo que llevó a proponer que la actividad de fosfatasa de *cdc25* remueve el fosfato que transfiere *wee1*. Un análisis más detallado de la *p34^{cdc2}* ha demostrado que las actividades de *wee1* y *cdc25*, determinan el estado de fosforilación

del residuo de tirosina localizado en la posición 15 (tyr 15) y que la presencia de este fosfato abate la actividad de cinasa de *p34^{cdc2}*, mientras que al no estar fosforilado la enzima muestra una gran actividad (1, 8, 9 y 10). Varios estudios más finos sobre la fosforilación de fragmentos peptídicos de *p34^{cdc2}*, permitieron determinar que además de en la tyr15, *p34^{cdc2}* es fosforilada en otros dos residuos, pero esta vez de treonina: thr14 y thr161. La fosforilación de estos dos residuos no puede llevarse a cabo por *wee1* (una tirosilcinasa), lo que sugiere la participación de otras seril-treonilcinasas que aún no han sido identificadas pero que juegan un papel importante en la regulación positiva de *p34^{cdc2}*. La proteína cinasa codificada por el gen *mik1*, recientemente identificado, actúa junto con *wee1* y probablemente es responsable de esta última fosforilación.

LAS CICLINAS SON PROTEINAS ASOCIADAS A LA *p34^{cdc2}* NECESARIAS PARA LA REGULACION DEL CICLO CELULAR

La relevancia de las ciclinas como subunidades reguladoras del complejo fue propuesta desde los primeros experimentos con MPF y el análisis genético de levaduras. Los estudios de microinyección con MPF hicieron pensar que el elemento efector del complejo es la seril-treonilcinasa (*p34^{cdc2}*) cuya acti-

vidad requiere de la presencia de una subunidad reguladora p62. Este modelo se repetía en los estudios genéticos en donde la función de las subunidades catalíticas CDC28 (en *Saccharomyces cerevisiae*) y CDC2 (en *Schizosaccharomyces pombe*) requieren de una subunidad reguladora cdc13. Estas ciclinas fueron descritas inicialmente por los grupos de Hunt y Beach (1, 11 y 12). La secuenciación de los ADNc de las diferentes ciclinas ha llevado a identificar dos regiones conservadas: una que participa en su papel regulador y la otra que determina su vida media. La secuencia de interacción con la subunidad catalítica es una región de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, denominada la caja de ciclinas (8, 10 y 11). Un segundo dominio, presente únicamente en las ciclinas mitóticas, asegura su destrucción una vez que su función ha sido completada, la secuencia RALGN es reconocida por las enzimas que conjugan ubiquitina y favorecen la degradación de las ciclinas (8). Este mecanismo explica su rápida desaparición una vez terminada su función. La figura 4 presenta de manera esquemática los momentos en los que se expresan y degradan las diferentes ciclinas de metazoarios.

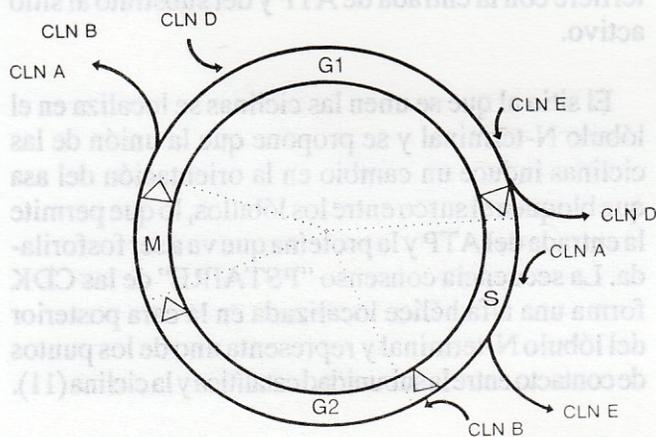


Figura 4. Participación de las distintas ciclinas a lo largo del ciclo celular. Puntos de síntesis (flechas de entrada al ciclo) y degradación (flechas de salida) de ciclinas a lo largo del ciclo celular de mamíferos.

Las primeras ciclinas fueron identificadas como la proteína p62 asociadas al MPF de ovocitos de rana y el producto del gen *cdc13* en *Schizosaccharomyces pombe*. Otras tres ciclinas (CLN1, CLN2, CLN3) fueron clonadas en *Saccharomyces cerevisiae* (Fig 3). Estas ciclinas se expresan durante la fase G₁ y se asocian a la cinasa CDC28 y permiten el inicio del ciclo celular. Es interesante notar que estas ciclinas

son capaces de substituir la función unas de otras, ya que los mutantes de CLN1 pueden proliferar por medio de la utilización de CLN2 y CLN3. En metazoarios las ciclinas expresadas durante la fase G₁ son las ciclinas D (D1, D2 y D3), que aparecen en respuesta a factores proliferativos (Fig 1 y Fig 4). A la expresión de las ciclinas D sigue la expresión de la ciclina E que al unirse a la CDK2 participa en la regulación del punto crítico de la fase G₁ denominado: punto de restricción "W" en células de mamíferos y "start" en levaduras. Se postula que el complejo formado por CDK2 y la CLN E participa en un fenómeno irreversible y que probablemente representa el último punto de control antes de iniciar la duplicación del ADN. Las ciclinas mitóticas A y B son sintetizadas durante las fases S y G₂ y forman complejos con las subunidades catalíticas que poseen la mayor actividad de proteína cinasa durante la transición de G₂ a M (1 y 11). Las ciclinas de levadura CDC13 y las ciclinas de metazoarios CLN A y CLN B, han sido denominadas ciclinas mitóticas ya que forman parte de los complejos que impulsan el ciclo a través de S, G₂ y M.

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA p34^{cdc2} POR FOSFORILACION Y POR ASOCIACION CON CICLINAS

La p34^{cdc2} al igual que todas las seril-treonilquinasas cataliza la transferencia del grupo fosfato gamma del ATP al hidróxilo de los residuos de serina y treonina de las proteínas, que actúa como nucleófilo aceptor del fosfato. La regulación de la enzima consiste en modular la capacidad de la misma para catalizar esta reacción.

Desde los primeros estudios con MPF y durante el desarrollo de los experimentos con CDC2 y CDC28, se postuló que la cinasa pasa de un estado activo a uno inactivo sin necesidad de ser degradada y que tanto las reacciones de fosforilación y desfosforilación, como la asociación con las subunidades reguladoras (ciclinas), intervenían en esta transición. Hoy se sabe que el enlace a la ciclina provoca un cambio conformacional de la subunidad catalítica que permite reacciones de fosforilación, posibles sólo cuando la ciclina está unida. Esta fosforilación ocurre sobre el residuo de treonina 160, lo que hace posible que el complejo se active como una cinasa (9). La desfosforilación ocurre de manera simultánea a la degradación de la ciclina y la subunidad

catalítica inactiva queda disponible para su reasociación con nuevas moléculas de ciclina (Fig 5A).

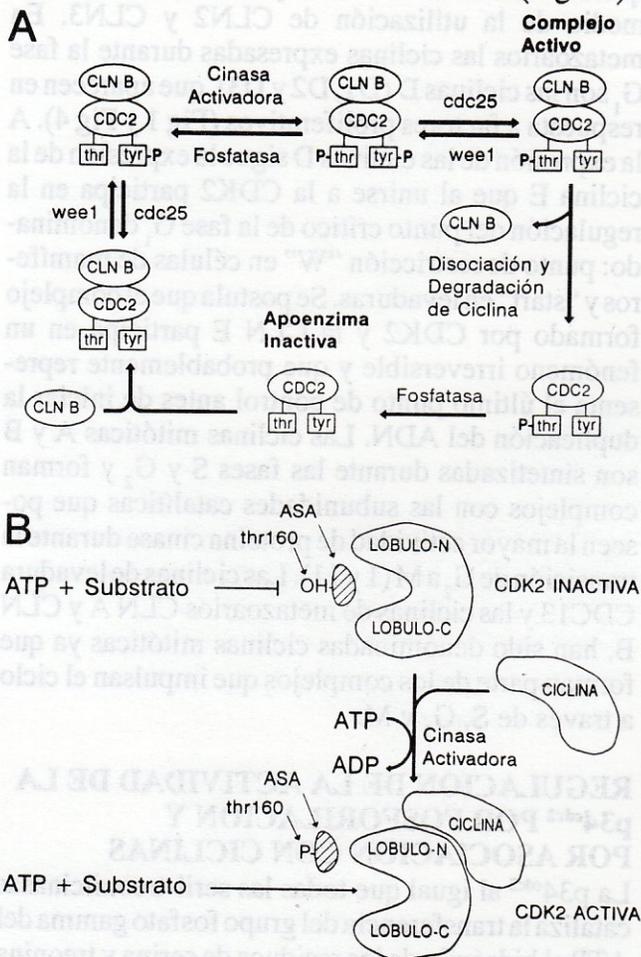


Figura 5. Regulación de la actividad de CDK2. A) Ciclo de activación por asociación a ciclinas y fosforilación, representada por -P. El producto génico del gen *wee1* es una tirosina cinasa, mientras que el producto génico de *cdc25* es una fosfatasa de tirosinas. B) Esquema de la estructura de la CDK2, que muestra el asa que previene la entrada del ATP y los sustratos al sitio activo. La activación requiere un desplazamiento del asa que necesita de la unión de la ciclina y posteriormente de una fosforilación del residuo de treonina 160. Adaptada de las referencias 10 y 11.

Algunos estudios recientes de sobreexpresión e inmunoprecipitación *in vivo*, han confirmado que las ciclinas deben estar asociadas a las subunidades catalíticas para que la actividad de seril-treonil cinasa se manifieste (1, 8 a 13). Ya que la presencia de las ciclinas como subunidades reguladoras, es esencial para el funcionamiento de estas proteínas cinasas, reciben el nombre de CDKs. Esta familia de CDKs incluye 10 genes diferentes de los cuales el mejor estudiado es $p34^{cdc2}$ al que también se le llama *cdk1*

y *cdk2* (Tabla I). Otras seril-treonilproteínas cinasas con regulación alostérica positiva son la proteína cinasa C (dependiente de diacilglicerol) y la proteína cinasa A (dependiente de AMP cíclico), activadas por la ocupación de sitios alostéricos por sus respectivos moduladores (1, 9 y 10). La cristalización de una de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas de humano (CDK2) ha explicado el mecanismo por el cual las ciclinas al unirse a sitios alostéricos aumentan la actividad enzimática (10 y 11). La proteína cinasa presenta dos lóbulos, denominados C y N terminales, entre los que se encuentra un surco dentro del que se localizan los sitios de unión del ATP y del sustrato y el sitio activo que lleva a cabo la transferencia del fosfato gamma (Fig 5B). Hay dos características estructurales que distinguen a las CDK de otras proteínas cinasas: 1) La orientación de los residuos de lisina y asparagina críticos, que permiten la interacción con los fosfatos del ATP, y 2) la existencia de una pequeña asa localizada en el surco entre los dos lóbulos de la enzima. Por una parte la orientación de los residuos que unen ATP afecta el alineamiento entre el fosfato gamma y el grupo OH aceptor, mientras que la presencia del asa en el surco interfiere con la entrada de ATP y del sustrato al sitio activo.

El sitio al que se unen las ciclinas se localiza en el lóbulo N-terminal y se propone que la unión de las ciclinas induce un cambio en la orientación del asa que bloquea el surco entre los lóbulos, lo que permite la entrada del ATP y la proteína que va a ser fosforilada. La secuencia consenso "PSTAIRE" de las CDK forma una alfa hélice localizada en la cara posterior del lóbulo N-terminal y representa uno de los puntos de contacto entre la subunidad catalítica y la ciclina (11).

Como ya se mencionó, tanto $p34^{cdc2}$ como la CDK2 presentan sitios de fosforilación que ejercen influencia positiva y negativa sobre la actividad de la enzima. Los resultados de estos estudios demuestran que hay una fosforilación que activa a la enzima, que corresponde al residuo de treonina 160, mientras que hay dos fosforilaciones que abaten su actividad, correspondientes a los residuos de tirosina 14 y de treonina 15 (9 y 14). El residuo de treonina 160, localizado en el asa que bloquea la entrada al sitio activo, ha sido propuesto como el residuo que debe ser fosforilado para mover el asa haciendo posible la unión del ATP. Por otra parte los residuos

que inhiben la actividad se localizan en el lóbulo N-terminal, cerca del sitio de unión al ATP y al sustrato, por lo que se propone que su fosforilación repele al ATP e interfiere con la unión de la proteína sustrato (9, 13 y 14).

En resumen, la actividad de la p34^{cdc2} resulta de cambios en la asociación con ciclinas y otras proteínas y de la actividad de CDK-proteína cinasas y fosfatasa. La figura 5B muestra el modelo actual que, con base en las evidencias experimentales, propone la manera en que se regula la actividad de p34^{cdc2} a lo largo del ciclo celular.

PERSPECTIVAS EN EL ESTUDIO DE LA REGULACION DE LAS PROTEINAS CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS

Es mucho lo que se ha avanzado desde los primeros experimentos de microinyección de ovocitos de rana y las mutaciones *cdc* en levaduras hasta la cristalización de la CDK2 de humano, sin embargo se está sólo al principio del estudio bioquímico de la regulación del ciclo celular. Aún quedan por definir proteínas como SUC1 que forman parte del complejo p34^{cdc2}-ciclina, cuya presencia es indispensable para la función enzimática (1 y 7).

Hay también dos familias de proteínas inhibitoras de la actividad de las proteínas cinasas. Será interesante saber cómo interactúan con el complejo CDK-ciclina y cómo se regula la expresión de estos inhibidores (8). Del mismo modo queda por definirse cuál es el papel de las múltiples isoformas de CDK y cómo se determina su expresión.

Si bien la interacción entre p34^{cdc2} y las ciclinas ha sido caracterizada con gran detalle, aún queda por comprenderse cómo es que las ciclinas instruyen a las cinasas con respecto a cuál sustrato fosforilar y más importante aún, cuáles son los sustratos naturales. Ya que las CDKs son en última instancia fosfotransferasas, hace falta aún identificar a las fosfatasa que revierten el efecto de las CDKs.

En este momento parece que las transiciones de una fase a otra del ciclo celular son un resultado directo de la expresión y de la degradación de las distintas ciclinas en diversos puntos del ciclo. Se espera que el estudio de los promotores de las ciclinas pueda ayudar a explicar cómo se regula su expresión. Por otra parte, el estudio de los mecanismos de degradación de las ciclinas aparece como un campo prometedor.

Finalmente, el análisis de estos complejos enzimáticos abre la puerta para estudiar los acontecimientos bioquímicos que permiten coordinar la diversidad de fenómenos que conforman al ciclo celular como son: duplicación, condensación de los cromosomas, recombinación, disponibilidad de nutrientes y tamaño celular.

AGRADECIMIENTOS

Zentella A, fue apoyado por el Programa de Repatriación del CONACyT, y López Marure R, Gómez González E, Paredes García R E, Ibarra Sánchez M J son Becarios del CONACyT. Agradecemos a Dora H Reyes por la escritura del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Murray A y Hunt T (1993) *The cell cycle: an introduction*. Oxford University Press, New York NY, EUA. pp 1-65.
2. Alberts B, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson J D (1994) *Cell Division Cycle*. En: *Molecular biology of the cell*, Autores: Alberts B, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J D, 3ª edición. Garland Publishing, Inc, New York, EUA. pp 863-910.
3. De Robertis E D P, Saez F A y De Robertis E M F (1975) *Mitosis y Meiosis*. En: *Cell biology*, Autores: De Robertis E D P, Saez F A, De Robertis E M F, 6ª edición. W B Saunders Company, Philadelphia, EUA. pp 274-311.
4. Darnell J, Lodish H y Baltimore D (1986) *Growing and Manipulating cells and viruses*. En: *Molecular cell biology*, Autores: Darnell J, Lodish H, Baltimore D, 2ª edición. Scientific American Books, W H Freeman & Company, New York, EUA. pp 151-187.
5. Gardner E J, Simmons M J y Snustad D P (1984) *Cell mechanics*. En: *Principles of genetics*, 8a. edición, John Wiley & Sons, Inc New York, NY, EUA. pp 52-68.
6. Brooks R, Fantes P, Hunt T y Wheatley D (1989) *The cell Cycle*. *J Cell Sci*. Suplemento No. 12. pp i-vii.
7. Forsburg S y Nurse P (1991) *Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe**. *Ann Rev Cell Biol* 7:227-256.

8. Pines J (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical review. *Biochem J* 308:697-711.
9. Draetta G. (1993) Cdc2 activation: The interplay of cyclin binding and thr 161 phosphorylation. *Trends Cell Biol* 3:287-289.
10. De Bondt H L, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones H D, Morgan D O y Kim S H (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363:595-602.
11. Jeffrey P D, Russo A A, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J y Pavletich N P (1995) Mechanism of CDK activation by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376:313-320.
12. Lew D J y Reed S I (1992) A proliferation of cyclins. *Trends Cell Biol* 2:77-81.
13. Xiong Y, Connolly T, Futcher B y Beach D (1991) Human D-type cyclin. *Cell* 65:691-699.
14. Yong G, Rosenblatt J y Morgan D O (1992) Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of thr160 and tyr15. *EMBO J* 11:3995-4005.

Finalmente, el análisis de estos complejos enzimáticos abre la puerta para estudiar los acontecimientos bioquímicos que permiten coordinar la diversidad de fenómenos que conforman el ciclo celular como son: duplicación, condensación de los cromosomas, recombinación, disponibilidad de nutrientes y tamaño celular.

AGRADECIMIENTOS

Zentella A, fue apoyado por el Programa de Investigación del CONACYT y López Marure R, Gómez González E, Paredes García R E, Ibarra Sánchez M de J son Becarios del CONACYT. Agradecemos a Don H Reyes por la escritura del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Gardner E J, Simmons M J y Sautter D P (1984) Cell mechanics. En: Principles of genetics, 8a. edición, John Wiley & Sons, Inc New York, NY, EUA. pp 32-68.

2. Brooks R, Fantes F, Hunt T y Wessley D (1989) The cell cycle. *J Cell Sci*, Suplemento No. 12, pp i-vii.

3. Forsburg S y Nurse P (1991) Cell cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Ann Rev Cell Biol* 7:227-256.

4. Danell J, Lodish H y Baltimore D (1986) Growing and dividing cells: an introduction. *Cell* 45:1-62.

5. Roberts E D P, Szec F A y De Robertis E M F (1972) Mitosis y Meiosis. En: Cell Biology, Autores: De Robertis E D P, Szec F A, De Robertis E M F, 6a. edición, W B Saunders Company, Philadelphia, EUA. pp 274-311.

6. Roberts E D P, Szec F A, De Robertis E M F (1972) The cell cycle: an introduction. *Cell* 45:1-62.

ASPECTOS MOLECULARES Y CLINICO-PATOLOGICOS DE LA FUNCION CHAPERONINA

Antonio Liras Martín. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco 28049, Madrid, España. Fax: 3974870.

Recibido: Agosto 29 de 1995.

Bol Educ Bioq (México) XV(1):13-17

RESUMEN

Las chaperoninas son proteínas que reconocen y estabilizan determinados intermediarios del proceso de plegamiento o de translocación proteica. Estas proteínas, en general, se requieren para el plegamiento postraduccional, destino y ensamblaje de proteínas. Para su actuación precisan el concurso del ATP cuya hidrólisis conlleva cambios conformacionales que promueven un plegamiento de forma cíclica y cooperativa. Las chaperoninas por su función son inmunógenos dominantes, están implicados en ciertas enfermedades autoinmunes y en procesos de biogénesis viral, así como en las denominadas *patologías chaperón*, que se caracterizan por un defecto en el plegamiento funcional de una determinada proteína, debido a una mutación en una chaperonina específica o bien en la propia secuencia proteica de reconocimiento.

PALABRAS CLAVE: Plegamiento proteico, chaperoninas, enfermedad autoinmune, biogénesis viral, patología chaperón.

ABSTRACT

The chaperonins are proteins which recognize and stabilize certain protein folding and translocation intermediates. In general, these proteins are necessary for postraduction folding, location and protein assemble. The function of these proteins is based on the ATP hydrolysis that is used to perform conformational changes that promote a cyclic and cooperative folding. In this sense, the chaperonins are dominant immunogens implicated in certain autoimmunes pathologies, viral biogenesis processes and in the named *chaperon pathologies* which are characterized by a defect in the functional folding of a determinate protein by a mutation on a specific chaperonin or in the proper protein target sequence.

KEY WORDS: Protein folding, chaperonins, autoimmune pathology, viral biogenesis, chaperon pathology.

INTRODUCCION

El primer nivel de organización en una proteína, la secuencia de aminoácidos, es dictada por la secuencia del DNA en un gen específico para dicha proteína y es la responsable de los distintos niveles de estructuración tridimensional específica que condicionan su funcionalidad.

Ya como postuló Pauling en 1950 la estructuración secundaria de una proteína debería cumplir con una serie de postulados. En primer lugar, que las longitudes y ángulos de enlace se debían distorsionar lo menos posible. En segundo lugar, dos átomos se aproximarían uno a otro en función de los radios de van der Waals. Tercero, el grupo amido del enlace peptídico permanecería planar en configuración *trans*, y cuarto, se necesitarían uniones no covalentes para estabilizar una estructura terciaria como puede ser la unión por puentes de hidrógeno. Hasta aquí, y de acuerdo con estos postulados la estructura secundaria de una proteína, ya fuera en alfa hélice o en lámina beta plegada, en función de los ángulos ϕ y ψ , no parecería demasiado compleja. La complicación comenzaría con la estructura terciaria de la proteína en forma de dominios estructurales o regiones compactas que presentan una elevada estructuración y que se relacionan estrechamente con la funcionalidad de la proteína, fruto del proceso que se denomina plegamiento.

La información que determina la estructura tridimensional de una proteína está contenida en la secuencia aminoacídica y está relacionada con determinados factores termodinámicos como pueden ser las interacciones electrostáticas, los enlaces de hidrógeno o las interacciones de van der Waals, con

ciertos efectos hidrofóbicos o con los enlaces disulfuro; todos éstos condicionan, de alguna manera, la cinética del plegamiento. Los estudios *in vitro* sugieren que el plegamiento es consecuencia de un colapso hidrofóbico en determinadas regiones de la proteína. Los estudios *in vivo* demuestran, por otra parte, que aunque los dominios de un polipéptido naciente se pueden plegar muy rápido, la adquisición de una estructura nativa final puede proceder más lentamente en función de las diferentes condiciones del medio o la presencia de determinadas proteínas coadyuvantes. Entre estas proteínas se encuentran la proteína disulfuro isomerasa que cataliza la reacción de intercambio tio-disulfuro o las peptidil prolil cis-trans isomerasas que catalizan las isomerizaciones a nivel de prolinas.

Un tercer grupo más amplio de proteínas que intervienen en el proceso de plegamiento es el de las chaperoninas (1 y 2), proteínas que no funcionan *in vivo* como catalizadores en la formación de estructura terciaria, sino que actúan en el reconocimiento y estabilización de determinados intermediarios del proceso de plegamiento o de translocación.

ASPECTOS MOLECULARES DE LA FUNCION CHAPERONINA

De forma coloquial el término "chaperón" o "carabina" se utiliza para describir a aquella persona, generalmente casada, que acompaña a jóvenes solteras en público como guía y protector. Con respecto a esta definición, desde un punto de vista molecular, una chaperonina sería aquella molécula que evitaría interacciones indeseables entre superficies potencialmente complementarias.

El desarrollo del concepto de molécula "carabina" ha seguido un camino tortuoso que ha pasado por el estudio de las llamadas proteínas de choque térmico, descubiertas por el genetista italiano Ritossa en 1962 cuando olvidó en el radiador su preparación de glándulas salivares de drosófila y observó que el aumento de la temperatura provocaba la activación de ciertos genes y la síntesis de las llamadas proteínas de choque térmico (3). Curiosamente hoy sabemos que muchas de estas proteínas presentan función chaperonina.

El término chaperonina fue utilizado por primera vez por Laskey y colaboradores (4) para describir la

acción de la nucleoplasmina que es una proteína nuclear que media el ensamblaje *in vitro* de los nucleosomas a partir de las histonas y del DNA. Las chaperoninas conforman un grupo amplio de proteínas ubicuas que incluyen a proteínas tan importantes como la Rubisco en plantas o las GroEL de *Escherichia coli*, que se requieren, en general, para el plegamiento postraduccional, destino y ensamblaje de proteínas y que, además, según la primera definición de Ellis (1), no formarían parte de la proteína nativa y funcional totalmente plegada.

La primera evidencia experimental de la función chaperonina se demostró por Bochkareva en 1988 al observar que la proteína más importante de choque térmico en *Escherichia coli*, la GroEL, estaba asociada a proteínas en formación y que se separaba de éstas cuando adquirían su estructuración definitiva. Parecía, por tanto, que esta proteína intervenía de manera transitoria en el proceso de plegamiento. En este mismo año, el grupo de Ellis puso de manifiesto una función similar en organismos superiores, al observar que el ensamblaje de las dos subunidades que conforman la proteína Rubisco dependía de la acción transitoria de la proteína de unión a Rubisco (RBP). Las chaperoninas tendrían, entonces, una intervención en el ensamblaje. Una tercera evidencia se puso de manifiesto en estudios bioquímicos y genéticos sobre levaduras, realizados por Deshaies, quien comparó levaduras normales para la expresión de una proteína de choque térmico 70 (hsp70) con levaduras mutadas para esta proteína y observó que algunas proteínas sintetizadas en el citoplasma eran incapaces de transportarse al interior de ciertos orgánulos celulares como podían ser las mitocondrias. Por el contrario, la desnaturalización previa con urea facilitaba el paso transmembrana, lo que hizo pensar en un tercer tipo de función chaperonina que se basaría en el mantenimiento de un estado competente de translocación proteica.

En general, se puede hablar de dos tipos estructurales de chaperoninas, las de la clase I que se fijan preferentemente a zonas hidrófobas de las proteínas recién sintetizadas y así evitan posibles procesos de agregación, y las de la clase II que conforman enormes estructuras anulares con una cavidad central donde se aloja la proteína sustrato. En cualquier caso, una propiedad común de la función chaperonina es su capacidad de reconocer elementos estructura-

les expuestos en proteínas desplegadas o parcialmente desnaturalizadas como pueden ser las superficies hidrofóbicas. En este sentido, el papel primordial de una chaperonina sería el de prevenir las asociaciones inter o intramoleculares en una cadena polipeptídica y evitar una agregación, favorecer su plegamiento al permitir una determina cinética de plegamiento, o bien participar en los mecanismos relacionados con la translocación de proteínas, ya fuera como factor *cis* o permisivo que facilita la translocación al mantener una forma competente del polipéptido, o bien como factor *trans* o restrictivo, que evita el paso en reverso a través del poro de translocación, y facilita así el plegamiento funcional de la proteína.

Las chaperoninas son moléculas ubicuas que comprenden varias familias de proteínas como son la familia de la Hsp70 de la que son representante la DnaK, DnaJ o GrpE en procariotos; la familia de las Hsp60 como la GroEL y GroES en procariotos o las Hsp60 y Hsp10 en mitocondria; la familia de las Hsp90 como la Hsp83 y la familia de las TRIC o chaperoninas citosólicas como la TCP-1. Se pueden diferenciar a su vez, dentro de cada familia, las chaperoninas principales y las chaperoninas cohorte. Estas últimas facilitan la acción de las principales, como es el caso de GroES para GroEL.

Las chaperoninas, en general, tienen dos dominios estructurales, uno altamente conservado de 450 aminoácidos en el extremo N-terminal que presenta actividad de ATPasa, y otro menos conservado en el extremo C-terminal de 200 aminoácidos que representa el sitio de reconocimiento para el sustrato polipeptídico. Entre estos dos dominios se localiza, además, un sitio sensible a proteasas.

En función de esta estructura la acción chaperonina se podría resumir en que el sustrato polipeptídico promueve, al interaccionar con la región no conservada, la hidrólisis del ATP (5) por una actividad ATPasa. Esto provocaría cambios conformacionales que dejarían al descubierto el sitio sensible a proteasa y esta ruptura alteraría el estado oligomérico de la chaperonina y produciría diversos cambios conformacionales que se transmitirían al sustrato polipeptídico y promoverían así su plegamiento. Otras características de la función chaperonina serían su acción cíclica y cooperativa.

Frente al concepto de chaperonina establecido por Ellis, es decir aquellas moléculas que participan en la estabilización, plegamiento o ensamblaje de proteínas y que no forman parte de la proteína asistida y finalmente funcional, Shinde e Ynougé (6) han postulado la existencia de posibles regiones dentro de una proteína madura, especialmente aquellas de la familia de la subtilisina, que actuarían con función de chaperoninas intramoleculares y que se diferenciarían fundamentalmente de las moleculares por formar parte de la proteína a plegar, de la que posteriormente se separan por ruptura proteolítica y su función no depende de la hidrólisis de ATP.

RELEVANCIA CLINICO-MOLECULAR DE LA FUNCION CHAPERONINA

El reconocimiento de que las chaperoninas participan en un gran número de procesos celulares fundamentales (7) ha conducido a relacionarlas con diversos aspectos clínico-patológicos de gran relevancia en medicina y biotecnología.

Las chaperoninas que son proteínas de *estrés*, es decir, que su expresión génica se induce por calor o condiciones de emergencia celular, son también, en primer lugar, inmunógenos dominantes en infecciones bacterianas en humanos y parecen estar implicadas en determinadas enfermedades autoinmunes (8). Así, en particular, la proteína chaperonina GroEL, que se produce en gran cantidad por bacterias, induce la síntesis de anticuerpos. Debido a la alta homología entre la proteína del huésped y la de las bacterias se generan autoanticuerpos y así, en concreto, en la tuberculosis se han descrito procesos de artritis reumatoide crónica, caracterizados por la producción de autoanticuerpos contra determinadas proteínas del paciente.

Una segunda relevancia clínico-patológica de la función chaperonina es la posible relación entre esta función y determinadas patologías que se pueden denominar como *patologías o enfermedades chaperón*. En este sentido y entre estas posibles *patologías chaperón* algunas patologías mitocondriales pueden ser óptimas candidatas. Así, la deficiencia en humanos de la carnitina palmitoil transferasa (9) (hCPTasa), enzima que participa en la translocación de ácidos grasos hasta la matriz mitocondrial donde sufren la β -oxidación, se caracteriza, en su forma adulta, por episodios recurrentes

de necrosis muscular, y por episodios de hipoglucemia no cetónica, hiperamoniemia, coma e incluso, en su forma infantil o grave, la muerte. Esta última podría estar relacionada con un fallo en la función chaperonina. Se han identificado mutaciones en esta proteína, que muestra, después de expresarse *in vitro*, un valor normal de K_m y una síntesis normal, mientras que presenta una relevante reducción en la actividad catalítica, en sus niveles estacionarios y en su estabilidad molecular. Si se examina el alineamiento de ciertos residuos de hCPTasa frente a secuencias con función chaperonina intramolecular de la familia de la subtilisina descritas por Shinde e Inouge (6) se encuentra una homología relativa especialmente a nivel de dos motivos de residuos hidrofóbicos. Ya que estas regiones parecen participar en el proceso de plegamiento para aquellas proteínas que las presentan, las mutaciones descritas para esta proteína podrían explicar la deficiencia en hCPTasa debida a un defecto en el plegamiento, ensamblaje y estabilidad de la proteína. En este sentido, Agsteribbe y colaboradores (10) postulan la existencia de posibles patologías mitocondriales debidas a una deficiencia en la expresión de una chaperonina. En este caso se estudia un paciente con enfermedad sistémica mitocondrial fatal caracterizada por rasgos faciales incontrolados y anormales, acidosis metabólica, hipotonía, severa acidosis láctica, disminución en la actividad de diversas proteínas mitocondriales multiméricas así como cambios morfológicos y estructurales en las mitocondrias en cuanto a su forma, tamaño, distribución celular y continuidad de membrana. Pero sobre todo se encuentra una deficiencia de hsp60, en pacientes frente a controles mientras no existen cambios en las hsp70. Más recientemente estos mismos autores (11) han concretado que este defecto puede estar relacionado con una disminución en la síntesis de la proteína hsp60 y no en el incremento de su degradación, así como en un retardo en el procesamiento de la proteína en estos pacientes.

Una tercera relevancia clínico-patológica relacionada con la función chaperonina sería la relativa a su participación en la morfogénesis y biogénesis viral (12). Se ha descrito recientemente por Lingappa y colaboradores (13) el papel que tiene en la morfogénesis viral de una chaperonina relacionada con la familia TCP-1 o chaperoninas citosólicas de eucariotes, concretamente en el caso del virus de la

hepatitis B que presenta una cápsida multimérica de 180 monómeros de 21kDa que se ensambla en el citosol de los hepatocitos infectados. Estos autores, por técnicas de encapsulación *in vitro* mediante sistemas libres de células y con extractos celulares de germen de trigo, obtienen partículas virales que se asemejan a las verdaderas partículas del virus en cuanto a su velocidad de sedimentación, su resistencia a proteasas o su identidad en microscopía electrónica. Por otra parte, por técnicas de inmunodetección de las distintas regiones de un gradiente de sacarosa durante el ensamblaje de la proteína que conforma la cápsida, se comprueba que durante la encapsulación se obtiene un intermediario de alto peso molecular al que se asocia una chaperonina citosólica que se separa una vez que se ha completado el ensamblaje. Esto puede permitir comprender mejor los procesos de morfogénesis viral así como plantear la posibilidad de una futura estrategia terapéutica antiviral.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En conclusión, la función chaperonina puede tener un significado importante en la medicina y la clínica a partir de un punto de vista molecular, desde por su carácter inmunógeno dominante en ciertas infecciones bacterianas hasta por su participación directa en determinadas patologías hereditarias e incluso por su posible relación con las enfermedades autoinmunes o con la morfogénesis viral.

En cualquier caso, su participación se relacionaría con un defecto en el ensamblaje o plegamiento de determinadas proteínas, ya sea por una falla en la propia síntesis de la chaperonina o en su secuencia, o bien por una alteración en la secuencia de reconocimiento del polipéptido que se ha de plegar. En concreto, las miopatías mitocondriales son buenas candidatas para ser definidas como *patologías chaperón*. Este tipo de patologías podrían ser en un futuro tratadas mediante la sobreexpresión de la chaperonina correspondiente a partir de genes insertados de forma semejante a la supresión de determinadas mutaciones que afectan al ensamblaje de proteínas en *Escherichia coli* (14).

Por otro lado, algunos bacteriófagos requieren chaperoninas de *Escherichia coli* para su duplicación. Este hecho abre las puertas a estrategias de mutagénesis que puedan afectar a las chaperoninas

relacionada con la duplicación del virus pero no con aquellas que afectan a la viabilidad de la célula blanco.

Desde un punto de vista biotecnológico en la obtención, por técnicas recombinantes, de determinados productos farmacológicos, generalmente proteínas, el estudio de las chaperoninas que participan en su ensamblaje y plegamiento funcional, podría facilitar y aumentar el rendimiento en la producción de estas sustancias, ya que uno de los problemas más importantes en estos procesos es lograr su óptimo plegamiento funcional. De esta forma, se podrían idear sistemas *in vitro*, en presencia de las

chaperoninas correspondientes, que facilitarían la producción de proteínas activas con un mejor rendimiento biotecnológico, así se evitarían los procesos de agregación y formación de cuerpos de inclusión.

En definitiva, el conocimiento molecular de la función chaperonina puede dilucidar la etiopatogenia de determinadas patologías hereditarias relacionadas con un defecto en el plegamiento de proteínas, o paliar otras de origen viral. Además, puede permitir una producción más rentable de sustancias farmacológicamente activas, generalmente proteínas, mediante técnicas recombinantes.

REFERENCIAS

1. Ellis RJ (1991) Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 60:321-347.
2. Saibil H y Wood S (1993) Chaperonins. *Current Biology* 3:207-213.
3. Craig E A, Weissman J S y Horwich A L (1994) Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 78:365-372.
4. Laskey R A, Honda B M, Mills A D y Finch J T (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275:416-420.
5. Todd M J, Viitanen P V y Lorimer G H (1994) Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science* 265:659-666.
6. Shinde U e Inouye M (1993) Intramolecular chaperones and protein folding. *Trends Biochem Sci* 18:442-446.
7. Rutherford S L y Zuker C S (1994) Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell* 79:1129-1132.
8. Young D B, Lathigra R, Hendrix R, Sweetser D y Young R A (1988) Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci* 85:4267-4270.
9. Demaugre F, Bonnefont J P, Mitchell G, Nguyen-Hoang N, Pelet A, Rimoldi M, DiDonato S y Saudubray J M (1988) Hepatic and muscular presentations of carnitine palmitoyltransferase deficiency: two distinct entities. *Pediatr Res* 24:308-311.
10. Agsteribbe E, Huckriede A, Veenhuis M, Ruiters M H J, Niezen-Koning K E, Skjeldal O H, Skullerud K, Gupta R S, Hallberg R, van Diggelen O P y Scholte H R (1993) A fatal, systemic mitochondrial disease with decreased mitochondrial enzyme activities, abnormal ultrastructure of the mitochondria and deficiency of heat shock protein 60. *Biochem Biophys Res Commun* 193:146-154.
11. Huckriede A y Agsteribbe E (1994) Decreased synthesis and inefficient mitochondrial import of hsp60 in a patient with a mitochondrial encephalomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1227:200-206.
12. Van der Vies S M, Gatenby A A y Georgopoulos C (1994) Bacteriophage T₄ encodes a co-chaperonin that can substitute for *E coli* GroES in protein folding. *Nature* 368:654-656.
13. Lingappa J R, Martin R L, Wong M L, Ganem D, Welch W J y Lingappa V R (1994) A eukaryotic cytosolic chaperonin is associated with a high molecular weight intermediate in the assembly of hepatitis B virus capsid, a multimeric particle. *J Cell Biol* 125:99-111.
14. Van Dijk T K, Gatenby A A y LaRossa R A (1989) Demonstration by genetic suppression of interaction of GroE products with many proteins. *Nature* 342:451-453.

BACTERIAS LACTICAS COMO SISTEMA PARA LA PRODUCCION DE PROTEINA HETEROLOGA

Romina Rodríguez Sanoja. Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-228, México 04510, DF, México.

Recibido: Octubre 3 de 1995. Aceptado: Enero 30 de 1996.

Bol Educ Biol (México) XV(1):18-25

RESUMEN

Un número importante de investigadores en el mundo trabajan en el mejoramiento de cepas de bacterias lácticas para que puedan llevar a cabo fermentaciones más eficientes o desarrollar actividades nuevas. Todo este esfuerzo se da en gran medida porque estas bacterias son inocuas y pueden ser usadas en la industria alimentaria y farmacéutica prácticamente sin restricciones; esta característica permitiría que estos microorganismos se usaran en la producción "sana" de proteína heteróloga, si se tuvieran las herramientas suficientes para su manipulación genética. En este trabajo se revisa la información existente sobre la expresión de genes en *Lactococcus lactis* para evaluar la posibilidad de utilizar este microorganismo en la producción de proteínas heterólogas.

PALABRAS CLAVE: Bacterias lácticas, *Lactococcus lactis*, expresión de genes heterólogos.

ABSTRACT

An important number of research groups is currently working to improve lactic acid bacteria for more efficient fermentation capabilities or to find new useful activities for them. All these efforts have been done considering the harmless nature of these bacteria in food and pharmaceutical applications. This characteristic could allow the use of these microorganisms in the production of heterologous proteins. However, new genetic tools need to be developed in order to make feasible the genetic manipulation in these bacteria. In this paper an overview is presented on the current knowledge of the gene expression in *Lactococcus lactis* in order to consider the possibility of using this microorganism in the production of foreign proteins.

KEY WORDS: Lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, heterologous gene expression.

INTRODUCCION

Con la posible excepción de las levaduras, las bacterias lácticas han sido los microorganismos más usados por el hombre. Tradicionalmente se han utilizado en la producción de alimentos fermentados de muy diverso origen como vegetales, carnes, leches, etc. Sin embargo, la importancia de las fermentaciones lácticas no se restringe a la preservación de los alimentos, también son muy importantes en el desarrollo de sabores y texturas.

Además, se les ha atribuido diversos beneficios a la salud, como la disminución de desórdenes gastrointestinales, ya que son comensales de sistemas digestivos de mamíferos; se ha reportado que pueden detoxificar algunos carcinógenos, metabolizar el colesterol, aumentar la respuesta inmune e incluso disminuir la caries dental.

El término de bacterias lácticas comprende un grupo de microorganismos Gram-positivos, microaerófilos, que no forman esporas. En este grupo se encuentran diferentes vías de fermentación de carbohidratos cuyo producto final es, en algunos casos, exclusivamente ácido láctico (metabolismo homofermentativo) y en otros cuando menos el 50% lo es (metabolismo heterofermentativo). La producción de dicho ácido ocasiona una disminución del pH que inhibe el crecimiento de bacterias esporulantes; además, las bacterias lácticas producen algunos bioantagonistas como antibióticos y bacteriocinas.

El empleo industrial más importante de las bacterias lácticas es la fabricación de productos lácteos madurados. Esta es, de las industrias que utilizan microorganismos, la segunda en importancia después de las que producen bebidas alcohólicas. Aun-

que los quesos son los productos lácteos más importantes, también existen otros productos derivados de la leche que se consumen extensivamente, como el yoghurt, la crema agria, la mantequilla, el kefir (bebida alcohólica del Cáucaso hecha a base de leche fermentada), el kumiss (leche de yegua o de camella que se fermenta o destila, usada como bebida por las tribus Tártaras nómadas de Asia; también se hace a base de leche de vaca para usarse en dietas especiales) y la leche estilo búlgaro.

Estos microorganismos son capaces de secretar grandes cantidades de proteína a través de su membrana y pared hacia el medio de crecimiento. Esta característica, aunada al hecho de que se cuenta con una tecnología de fermentación bien establecida y a que estas bacterias son consideradas como inocuas, es decir GRAS (generally recognized as safe), ha llevado a muchos grupos de investigación a trabajar en la posibilidad de usar las bacterias lácticas (especialmente las pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*) en lugar de *Escherichia coli* para la producción de proteína heteróloga.

Como es sabido, en las bacterias Gram-negativas la proteína heteróloga no se exporta de manera eficiente y generalmente es acumulada en el espacio periplásmico, lo que resulta impráctico para una producción a gran escala. En cambio, en un microorganismo con un sistema de excreción eficiente, el proceso para recobrar y purificar una proteína, como un producto biológico activo, puede ser simple. No obstante, para poder competir con *Escherichia coli* es un requisito el desarrollo de métodos que permitan alcanzar niveles de producción semejantes a los obtenidos con la coliforme.

En este artículo, se revisa la información que se tiene sobre el género *Lactococcus*, para considerar la posibilidad de utilizarlo como sistema para la producción de proteína heteróloga.

TRANSFERENCIA DE GENES

En 1962 se reportó la primera transducción en *Lactococcus lactis* (1). Fue el primer proceso usado extensivamente en el análisis genético de las bacterias lácticas. Algunas características codificadas tanto en plásmidos como en los cromosomas han sido transferidas a través de virus. Dos de las funciones más importantes, que en ocasiones se presentan de

manera inestable en estas bacterias, la fermentación de lactosa y la producción de proteasas, se han podido estabilizar.

La fusión de protoplastos como un mecanismo de transferencia génica en *Lactococcus lactis*, fue posible gracias al desarrollo de los métodos de producción y regeneración de protoplastos. Con esta base se reportó en 1982 el primer éxito en la transformación con una eficiencia de 18.5 transformantes por microgramo de DNA. En trabajos posteriores se llegó a las condiciones óptimas, hasta que en 1986 se obtiene una eficiencia de 5×10^6 transformantes por microgramo de DNA para la resistencia a eritromicina (1).

A pesar de que se ha logrado obtener eficiencias razonables de transformación, los investigadores continúan enfrentándose a problemas para estandarizar y hacer reproducibles los métodos publicados, ya que la variación entre e intra cepas es muy alta. A la fecha, los protocolos para este objetivo se han modificado y se prefiere la electroporación como un método más eficiente y sencillo de transformación.

La electroporación es un método conveniente para introducir DNA de plásmidos en células vivas, ya que generalmente se tienen eficiencias de transformación más altas que con los métodos químicos.

No está claro cómo un campo eléctrico puede facilitar la entrada del DNA a las células sin afectar severamente el funcionamiento normal de las membranas; lo que sí se sabe es que al exponer a las células a campos eléctricos ocurre una serie de cambios físicos y biológicos en las mismas. Los campos eléctricos de baja intensidad polarizan las membranas celulares; si estos cambios inducen un potencial de membrana que se encuentre en el intervalo de 200 a 400 mV, se forman áreas de desorganización reversible, en donde se cree que pueden ocurrir rupturas transitorias, que hacen permeable a la membrana a ciertas moléculas y macromoléculas (2).

En *Lactococcus lactis* los primeros trabajos que se realizaron con este fin reportaban eficiencias de transformación en el intervalo de 1×10^2 a 5×10^5 transformantes por microgramo de DNA. En 1989 Holo y Ness consiguen optimizar las condiciones de transformación para *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*,

y es entonces cuando se habla de rendimientos superiores a 1×10^7 transformantes por microgramo de DNA. La innovación en este método es la utilización de glicina al 2.5%, como debilitador de la pared, en el medio de crecimiento de las células que van a ser transformadas. Desafortunadamente, el método no pudo ser utilizado en otras subespecies de *Lactococcus lactis*, ya que la glicina en tan alta concentración inhibe el crecimiento (3).

DESARROLLO DE LOS VECTORES DE CLONACION

Se ha desarrollado una amplia variedad de vectores para la transformación de las bacterias lácticas, algunos de los cuales tienen funciones específicas como aislamiento de promotores, terminadores, señales de secreción, de expresión, etc. Los sistemas para utilizar estos vectores generalmente han sido dos cepas de *Lactococcus lactis*, en las cuales los plásmidos que codifican los sistemas de restricción y modificación han sido eliminados. Estas son: *Lactococcus lactis* ssp *lactis* MG1363 derivada de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* NCDO712 (4) y *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IL1403 derivada de la cepa IL594 (5).

El desarrollo de vectores ha seguido básicamente dos estrategias: 1) El probar vectores con duplicones funcionales de otras Gram-positivas (Tabla I) y 2) El desarrollo de vectores a partir de plásmidos crípticos encontrados en las bacterias lácticas (Tabla II).

- 1) Vectores derivados de plásmidos heterólogos
 - a) pAMBeta1 - Es un plásmido conjugativo obte-

nido de *Streptococcus faecalis* a partir del cual se construyeron dos vectores: pIL252 y pIL253. Ambos plásmidos poseen el marcador macrolido-lincosamida-estreptogramidina B, que les confiere resistencia a la eritromicina. El pIL252 es un vector de bajo número de copias (6 a 9), mientras que el pIL253 se presenta en alto número (45 a 85). Estos plásmidos pueden incluir, de manera estable, fragmentos de DNA de hasta 30 kb.

b) pIP501El - El plásmido pGB301 fue obtenido por la pérdida espontánea de un fragmento del pIP501 de *Streptococcus faecalis*. Tiene como marcadores la resistencia a eritromicina y cloranfenicol. Es un plásmido grande (9.8 kb) con pocos sitios de restricción. Aún cuando acepta insertos grandes, a veces éstos sufren pérdidas de fragmentos de DNA de manera espontánea.

Se han desarrollado otros vectores que pueden duplicarse tanto en *Escherichia coli* como en *Streptococcus* spp como el pVA838, el pSA3 y los pMU1327 y pMU1328 pero no han sido utilizados extensivamente.

También se han probado plásmidos funcionales en *Bacillus subtilis* como el pE194, pC194 y pUB110 pero no han podido ser duplicados en *Lactococcus lactis*, a pesar de que los genes de resistencia a la eritromicina, cloranfenicol y kanamicina, que se encuentran en cada uno de estos vectores, han sido expresados normalmente en *Lactococcus*.

TABLA I

VECTORES DE CLONACION HETEROLOGOS

Vector	Duplicón	Tamaño (kb)	Gen marcador*	Número de copias	S R M+
pIL252	pAMβ1	4.7	Em	Bajo	Sí
pIL253	pAMβ1	5.0	Em	Alto	Sí
pGB301	pIP501	9.8	Em Cm	Bajo	No
pVA838	pAC&C184	9.2	Em Cm	Bajo	Sí
pSA3	pAC&C184	10.2	Em Cm Tm	Bajo	No
	pIP501				
pMU 1327/1328	pVA838	7.5	Em	Bajo	Sí

*Em = eritromicina, Cm = cloranfenicol, Tc = tetraciclina. +S R M = Sitio de restricción múltiple. Modificada de Leenhouts y Venema (6).

2) Vectores con duplicones lactococales

Todos los vectores que se han desarrollado hasta la fecha se han derivado de 2 plásmidos crípticos: el pWV01 de *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* y el pSH71 de *Lactococcus lactis* spp *lactis*. Ambos plásmidos son capaces de duplicarse, además de en *Lactococcus lactis*, en *Bacillus subtilis* y en *Escherichia coli*. El análisis de sus secuencias y modo de duplicación indican que pertenecen a la clase de plásmidos que generan intermediarios de hebra simple durante su duplicación por círculo rodante.

Como marcadores genéticos en estos plásmidos se han usado los genes de resistencia a la eritromicina, cloranfenicol y kanamicina. En algunos casos, estos genes ofrecen la posibilidad de clonar DNA al producir la inactivación del gen, lo que facilita la selección de transformantes. Por otro lado se han incluido sitios de restricción múltiple en los vectores para ampliar las posibilidades de inserción.

Además de los vectores generales, se han construido otros para identificar señales de transcripción, como promotores y terminadores, vectores de expresión y vectores con señales de secreción (Tabla III).

VECTORES DE INTEGRACION

Muchas de las funciones importantes de las bacterias lácticas se encuentran codificadas en plásmidos y se pueden perder fácilmente por la inestabilidad

segregacional de los mismos. Por esta razón, algunos grupos de investigación se dieron a la tarea de trabajar con vectores de integración. Se han desarrollado dos tipos de estos vectores: derivados de plásmidos heterólogos incapaces de duplicarse en *Lactococcus* y aquellos derivados del duplicón pWV01 (6).

EXPRESION GENETICA EN *Lactococcus*

Para poder hablar de mejoramiento o manipulación genética, es necesario el conocimiento y la comprensión de las señales que permiten la expresión de un gen.

a) Transcripción - A partir de los resultados obtenidos con los vectores para seleccionar promotores y de los datos de algunos genes de *Lactococcus lactis* aislados se identificaron las siguientes características comunes a los promotores lactococales (7): 1) Predominio de adenina en la posición 0 (inicio de la transcripción) y de timina en la posición -1. 2) Una secuencia -35 TTG y una región rica en adenina que recuerda la secuencia -10 (caja TATA) encontrada en otros promotores. 3) La distancia que separa las secuencias -10 y -35 tiene pocos nucleótidos más de los 17 o 18 que generalmente se encuentran en *Escherichia coli* y en *Bacillus subtilis*.

b) Traducción - En los genes de *Lactococcus lactis* que han sido clonados y analizados, principalmente aquellos que intervienen en el metabolismo de la lactosa, proteasas y genes de resistencia a fagos,

TABLA II

VECTORES DE CLONACION BASADOS EN DUPLICONES LACTOCOCALES

Vector	Duplicón	Tamaño (kb)	Gen marcador*	Número de copias	S R M+
pGK12	pWV01	4.4	Em Cm	Bajo	No
pGK13	pWV01	5.0	Em Cm	Bajo	No
pGKV21	pWV01	4.9	Em Cm	Bajo	Sí
pNZ12	pSH71	4.3	Cm Km	Alto	No
pNZ123	pSH71	2.8	Cm	Alto	Sí
pCK1	pSH71	5.5	Cm Km	Alto	No
pVS2	pSH71	5.0	Em Cm	—	No
pFX1	pD125	5.5	Cm	—	No
pFX3	pD125	4.5	Cm	—	Sí

*Em = eritromicina, Cm = cloranfenicol, Km = kanamicina, Tc = tetraciclina. +S R M = Sitio de Restricción Múltiple.

Modificada de Leenhouts y Venema (6)

TABLA III

VECTORES CON FUNCIONES ESPECIFICAS

Vector	Duplicación	Gen marcador*	Características relevantes	Tamaño (Kb)
Selección Promotor/terminador				
pGKV210	pWV01	Em	Gen <i>cat-86</i> sin promotor	4.4
pBV5030	pWV01	Em	Gen <i>cat-86</i> sin promotor	4.3
pMU1327	pVA380-1	Em	Gen <i>cat-194</i> sin promotor	7.5
pNZ336	pSH71	Cm Km	Gen de β -gal sin promotor	6.9
pGKV259	pWV01	Em Cm	Contiene entre el promotor P59 y el gen <i>cat-86</i> un sitio Sal I y un sitio Pst I	5.0
Señales de traducción				
pFX4, 5 y 6	pD125	Cm	Fusiones de señales de traducción con <i>lacZ</i>	6.7
Expresión y secreción				
pMG36e	pWV01	Em	Vector de expresión constitutiva, contiene el promotor lactococal P32	3.6
pMG36		Km		
Selección de péptido señal				
pGA14	pWV01	Em	Promotor SPO2 y gen <i>amy</i> sin secuencia señal	5.6
pGB14	pWV01	Em	Gen de β -lactamasa sin promotor y sin secuencia señal.	5.9

*Em = eritromicina, Cm = cloranfenicol, Km = kanamicina. Modificada de Leenhouts y Venema (6)

se ha observado que el codón de inicio de la traducción es casi siempre AUG, aunque también funcionan UUG y GUG. En la región que precede a este codón se encuentra la secuencia de Shine-Delgarno, complementaria al extremo 3' del RNAr 16S de *Lactococcus lactis* (3'-UCUUUCCUCCA-5').

No existe consenso sobre la utilización preferencial de codones por las bacterias lácticas, ya que éstas varían marcadamente entre los genes; aunque en general, se puede considerar que *Lactococcus lactis* muestra preferencia por codones con A o U en la última posición, lo que refleja el alto contenido de A + T del microorganismo (7).

EXPRESION DE GENES HETEROLOGOS

Además de los genes que codifican resistencia a los antibióticos, en *Lactococcus lactis* se han expresado genes heterólogos por fusión a señales de transcripción

y traducción propias del microorganismo. Por ejemplo, el gen *lacZ* de *Escherichia coli* fue fusionado al noveno codón del gen *prtP* de *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* para lograr su expresión, lo que permitió que una cepa deficiente en la utilización de lactosa, creciera en este sustrato (8). Se han utilizado los genes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus licheniformis* privados de sus secuencias líder para aislar y estudiar señales de secreción (9).

La dificultad en la manipulación de estas bacterias es patente en el hecho de que sólo se han clonado ocho genes heterólogos en *Lactococcus lactis* y, por lo tanto, no se puede hablar de que se encuentren sentadas las bases para el manejo de esta bacteria. En general los problemas a los que se enfrenta el investigador son de expresión muy pobre de los genes y en ocasiones inestabilidad plasmídica, tanto estructural como de segregación.

La mayoría de los genes que se han clonado han sido con el objeto de evitar la adición de enzimas purificadas, que en ocasiones se añaden para aumentar la disponibilidad de nutrientes durante algunos procesos de fermentación, o bien para aumentar la capacidad antimicrobiana en la conservación de granos y forrajes (Tabla IV). Una de las perspectivas más sorprendentes para la explotación de estas bacterias es su uso como vehículos para la administración de vacunas orales. Se están dando avances importantes en la manipulación genética de estos microorganismos, los resultados que se obtengan a corto plazo en la optimización de la expresión, secreción y presentación en la superficie celular, ya sea de proteínas heterólogas o epitopes proteicos, señalarán el camino en el futuro próximo. Por lo pronto, el primer paso se dio con la expresión funcional del fragmento C de la toxina del tétanos en *Lactococcus lactis* (10).

Según la naturaleza de la proteína heteróloga y el uso al que está destinada, es muy posible que se requiera mejorar la expresión genética. Hay varios caminos que se intentan seguir: una alternativa es aumentar el número de copias del gen, lo que ha demostrado ser funcional en algunos casos.

En el caso de un número de copias fijo, la expresión puede mejorarse al aumentar la eficiencia del inicio de la transcripción. Sin embargo, aún no es claro qué es lo que constituye un inicio de la transcripción "óptimo"; la estrategia más obvia es la de reemplazar el promotor presente en el gen de interés hasta encontrar aquel que funcione más adecuadamente, hasta el momento este camino parece ser uno de los más promisorios para mejorar la expresión, e incluso la estabilidad de la construcción. Esta estrategia se usó con éxito para incrementar la transcripción de algunas proteasas lácticas y para

TABLA IV

GENES HETEROLOGOS CLONADOS EN BACTERIAS LACTICAS
EN QUE SE UTILIZO COMO RECEPTOR A *Lactococcus lactis*

Gen	Origen	Vector	Uso y Referencia
Prochymosina	bovino	pNZ18	Producción de queso (11)
Lisozima	huevo	pMG36e	Actividad antimicrobiana (7)
Proteasa	<i>B subtilis</i>	pGKV210	Maduración del queso (7)
Lisozima	Bacteriófago T4 <i>E coli</i> Bacteriófago	pMG36e	Actividad antimicrobiana (7)
Alfa-amilasa	<i>B licheniformis</i>	pGAK1 pGBK1	Aislamiento de señales de exportación de proteínas
Luciferasa	<i>Vibrio fischeri</i>	pSB292	Estudios de la regulación del metabolismo de la lactosa (12)
Alfa-amilasa	<i>B stearo-thermophilus</i>	pNZ12	Aislamiento de señales de exportación (13)
Fragmento C de la toxina del tétanos	<i>C tetani</i>	pILPo1	Vacuna oral (10)

poder expresar genes de amilasa de *Bacillus* que no se habían podido expresar con sus propias señales promotoras.

Otro factor a considerar es la eficiencia en el inicio de la traducción. Algunos cambios introducidos en el RNAr 16S para incrementar la complementaridad con el sitio de unión del ribosoma, así como al ajustar el tamaño de la ventana existente entre la secuencia de Shine-Delgarno y el codón de inicio, puede incrementar en algunos casos la expresión. Sin embargo, al introducir cambios en estos sitios también se puede modificar la estructura secundaria del RNAm y afectar igualmente su expresión.

Otro proceso que puede afectar la expresión es la tasa de transcripción-traducción. En *Escherichia coli* se ha observado que existe una correlación directa entre esta variable y los niveles de expresión, así como con el uso preferente de ciertos codones y la abundancia de los RNAt. En *Lactococcus lactis* no existe suficiente información para afirmar que esta relación se da de tal forma que pueda ser usada para mejorar la expresión.

SECRECIÓN DE PROTEÍNA HETEROLOGA

Para hacer que *Lactococcus lactis* secrete la proteína heteróloga, se han usado dos estrategias. La primera contempla la identificación de señales de exportación en el cromosoma de la bacteria láctica mediante el uso de genes reporteros cuya actividad pueda ser identificada fácilmente como es el caso de algunas amilasas de *Bacillus* spp (9 y 13) y la beta-

lactamasa de *Escherichia coli* (14), cabe aclarar que estos genes no pudieron expresarse y no se obtuvo secreción con sus propias señales. Sin embargo, la funcionalidad de las señales heterólogas había sido demostrada con la secreción de la proteasa neutra de *Bacillus subtilis*; así mismo, se expresó y secretó la alfa-galactosidasa de *Cyamopsis tetragonoloba* al usar las señales de la alfa-amilasa de *Bacillus subtilis* (7).

CONCLUSIONES

Los estudios de las secuencias de las señales de transcripción y traducción, muestran un consenso considerable entre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Lactococcus lactis*. Sin embargo, al tratar de llevar esta similitud a la expresión de genes heterólogos, sucede que al basarse solamente en el parecido de las señales se está simplificando demasiado el asunto y tal vez habría que prestar mayor atención al diseño de las construcciones utilizadas para transformar y a las estructuras secundarias que se pueden estar formando.

En resumen, aún cuando *Lactococcus lactis* tiene mucho que ofrecer como sistema para la producción de proteína heteróloga, permanecen muchas lagunas de conocimiento, por lo que si bien se pueden expresar genes de otras especies, no se puede controlar y en ocasiones ni siquiera predecir el resultado de un experimento. Es necesario explotar las ventajas que *Lactococcus lactis* ofrece, pero primero se debe aumentar el conocimiento básico que se tiene sobre los mecanismos que operan en la expresión genética y en el transporte y secreción de proteínas en esta especie.

REFERENCIAS

1. Sandine W E (1987) Looking backward and forward at the practical applications of genetic research on lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 46:205-220.
2. Chassy B M y Flickinger J L (1987) Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol Lett* 44:173-177.
3. Wells J M, Wilson P W y Le Page R W F (1993) Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacteriol* 74:629-636.
4. Gasson M J (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCD0712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* 154:1-9.
5. Chopin A, Chopin M C, Moillo-Batl A y Langella P (1984) Two plasmid-determined restriction system in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11:260-263.
6. Leenhouts K J y Venema G (1994) Lactococcal plasmid vectors. En: *Plasmids*. Editor: Hardy D. IRL Press, Washington DC, pp 65-93.
7. van de Guchte M, Kok J y Venema G (1992) Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev* 88:73-92.
8. De Vos W M y Simons G (1988) Molecular cloning of

lactose genes in dairy lactic streptococci: the phospho-beta-galactosidase genes and their expression products. *Biochimie* 70:461-473.

9. Pérez-Martínez G, Kok J, Venema G, van Dijk JM, Smith H y Bron S (1992) Protein export elements from *Lactococcus lactis*. *Mol Gen Genet* 234:401-411.

10. Wells JM, Wilson PW, Norton PM, Gasson M y Le Page R W F (1993) *Lactococcus lactis*: high level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol* 8:1155-1162.

11. Simons G, Rutten G, Homes M y de Vos W M (1987) Production of bovine prochymosin by lactic acid bacteria. *Proc 4th Eur Congr Biotech* pp 183-187.

12. Eaton T J, Shearman C A y Gasson M J (1993) The use of bacterial luciferase genes as reporter genes in *Lactococcus* regulation of the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* lactose genes. *J Gen Microbiol* 139:1495-1501.

13. van Asseldonk K M, de Vos W M y Simons G (1993) Functional analysis of the *Lactococcus lactis* USP-45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and heterologous alfa-amylase. *Mol Gen Genet* 240:428-434.

14. Sibakov M, Koivula T, von Wright A y Palva I (1991) Secretion of TEM-beta-lactamase with signal sequence isolated from the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 57:341-348.

Este trabajo se realizó en el marco de un convenio de colaboración entre el grupo de Farmacología de la Universidad de Valencia y el grupo de Biotecnología de la Universidad de Zaragoza. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia de España. Los autores agradecen a los señores D. J. G. y D. J. M. por su colaboración en la realización de este trabajo.

Tr-D-Ala-Fen-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂

con la peculiaridad de que el contacto en el tejido de D-Ala en la segunda posición del cual depende su actividad biológica, ya que el péptido sintético con L-Ala en esa posición es totalmente inactivo. Se pudo demostrar que se trata de un producto de biosíntesis ribosomal por medio de la clonación de su precursor (3), en el cual, obviamente, el codón correspondiente al segundo residuo es el de L-Ala (GCG). De esta misma forma se ha aislado un péptido semejante al anterior, pero que tiene D-Met en la segunda posición del péptido y que se ha denominado Met-deltorina (o dactinocetina), específico para receptores opioides. Su estructura es la siguiente:

Tr-D-Met-Fen-His-Leu-Met-Asp-NH₂

La piel de la rana *Ptychocheilus bicolor* contiene dos péptidos, también específicos para receptores

Se conoce en la actualidad varios péptidos que, a pesar de ser sintetizados por la maquinaria ribosomal, contienen residuos de D-aminoácidos. Esto constituye un nuevo tipo de modificación posttranslacional, dependiente de uno o varios enzimas específicos que efectúa la isomerización por un probable mecanismo de deshidrogenación e hidrogenación estereoespecífica.

PALABRAS CLAVE: D-aminoácidos, biosíntesis de proteínas, ribosomas, código genético.

ABSTRACT
Various peptides are known to date that in spite of being synthesized by the ribosomal machinery, contain residues of D-amino acids. This is a new type of post-translational modification that depends on the reversible action of one or more enzymes that effect the isomerization probably by means of a mechanism of dehydrogenation and stereospecific hydrogenation.

KEY WORDS: D-amino acids, protein biosynthesis, ribosomes, genetic code.

Los conocimientos del código genético y de la biosíntesis de proteínas a nivel del ribosoma han mostrado una limitación absoluta a la incorporación de aminoácidos críptidos por ácidos ribonucleicos mensajeros y por ácidos ribonucleicos de transferencia; sólo el isómero L de los aminoácidos es utilizado e incorporado en el producto final. La quiralidad del carbono α de los aminoácidos es un determinante estereoespecífico del funcionamiento de la maquinaria sintetizadora de proteínas, siempre que ésta sea ribosomal.

D-AMINOACIDOS EN PEPTIDOS DE SINTESIS RIBOSOMAL

Alberto Huberman Wajzman. Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán". Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México 14000, DF, México.

Recibido: Octubre 31 de 1995.

Bol Educ Bioq (México) XV(1):26-30

RESUMEN

Se conocen en la actualidad varios péptidos que, a pesar de ser sintetizados por la maquinaria ribosomal, contienen residuos de D-aminoácidos. Esto constituye un nuevo tipo de modificación postraduccional, dependiente de una o varias enzimas reversibles que efectúa la isomerización por un probable mecanismo de deshidrogenación e hidrogenación estereoespecífica.

PALABRAS CLAVE: D-aminoácidos, biosíntesis de proteínas, ribosomas, código genético.

ABSTRACT

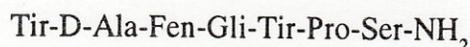
Various peptides are known to date that in spite of being synthesized by the ribosomal machinery, contain residues of D-amino acids. This is a new type of post-translational modification that depends on the reversible action of one or more enzymes that effect the isomerization probably by means of a mechanism of dehydrogenation and stereospecific hydrogenation.

KEY WORDS: D-amino acids, protein biosynthesis, ribosomes, genetic code.

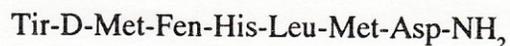
Los conocimientos del código genético y de la biosíntesis de proteína a nivel del ribosoma han mostrado una limitación absoluta a la incorporación de aminoácidos dirigida por ácidos ribonucleicos mensajeros y por ácidos ribonucleicos de transferencia: sólo el isómero L de los aminoácidos es utilizado e incorporado en el producto final. La quiralidad del carbono α de los aminoácidos es una determinante estereoquímica del funcionamiento de la maquinaria sintetizadora de proteínas, siempre que ésta sea ribosomal.

Existen algunas excepciones aparentes, como por ejemplo los antibióticos peptídicos bacterianos gramidina, tirocidina y bacitracina que contienen D-aminoácidos, pero estos casos son claramente de síntesis enzimática, sin participación de RNA mensajero ni de ribosomas (1) y por lo tanto, no se tomarán en cuenta en esta revisión.

Nuestro relato comienza en 1981, cuando un grupo de farmacólogos italianos describió el aislamiento de un péptido opioide de la piel de *Phyllomedusa sauvagei*, una rana arborícola suramericana (2). Este heptapéptido, denominado dermorfina, tiene una alta afinidad y selectividad por los receptores de opiáceos del tipo μ y si se inyecta en el cerebro de ratones o ratas produce una analgesia mil veces más efectiva que la morfina. La estructura de este péptido es la siguiente:

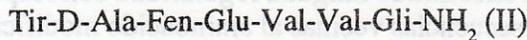
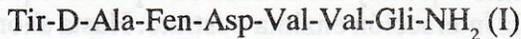


con la peculiaridad de contener un residuo de D-Ala en la segunda posición del cual depende su actividad biológica, ya que el péptido sintético con L-Ala en esa posición es totalmente inactivo. Se pudo demostrar que se trata de un producto de biosíntesis ribosomal por medio de la clonación de su precursor (3), en el cual, obviamente, el codón correspondiente al segundo residuo es el de L-Ala (GCG). De esta misma rana se ha aislado un heptapéptido semejante al anterior, pero que tiene D-Met en la segunda posición del péptido y que se ha denominado Met-deltorfina (o dermencefalina), específico para receptores opioides δ . Su estructura es la siguiente:



La piel de la rana *Phyllomedusa bicolor* contiene dos péptidos, también específicos para receptores

opioides δ , denominados [D-Ala²]deltorfinas I y II (4), cuyas estructuras son las siguientes:



Además, de esta misma rana se ha aislado un péptido de 33 residuos de aminoácidos denominado adenoregulina, que podría contener un D-aminoácido ya que su comportamiento cromatográfico es diferente al del péptido sintético (5).

De la piel de la rana *Phyllomedusa burmeisteri* se han aislado dos péptidos opioides, las [D-Leu²]deltorfinas I y II, de 17 residuos de aminoácidos, que tienen D-Leu en la segunda posición del péptido (6).

De la piel de otra rana, *Bombina variegata*, se ha aislado una familia de péptidos antimicrobianos y hemolíticos, las bombininas. Tres de ellos contienen D-aloisoleucina (D-alle) en lugar de L-Ile (7). Estos péptidos coexisten con sus L-isómeros y ambos son activos.

En invertebrados se ha encontrado el tetrapéptido achatina-I (Gli-D-Fen-Ala-Asp) en los ganglios del caracol gigante africano *Achatina fulica* Férussac, que contiene una D-Fen en la segunda posición (8). Este fue el primer neuropéptido en el que se comprobó la presencia de un residuo de D-aminoácido. Estos ganglios también contienen el péptido compuesto de L-aminoácidos, pero éste es inactivo. Los mismos autores han demostrado, por cristalografía de rayos X, que el residuo de D-Fen ocupa una esquina de un giro β de tipo II'. De este mismo caracol se ha aislado un pentapéptido, la fulicina (Fen-D-Asn-Glu-Fen-Val-NH₂) que contiene D-Asn en la segunda posición (9).

Del músculo retractor anterior del molusco *Mytilus edulis* se ha aislado un decapeptido relacionado con la FMRF-amida y que se ha denominado FFRF-amida. Este péptido contiene una D-Leu como segundo residuo de la secuencia Ala-D-Leu-Ala-Gli-Asp-His-Fen-Fen-Arg-Fen-NH₂ (10).

El antibiótico polipeptídico lactocina S, sintetizado en el sistema ribosomal del procarionto *Lactobacillus sake*, cepa L45, contiene además de D-Ala, una

serie de aminoácidos no convencionales como lantionina, β -metil-lantionina, deshidroalanina, deshidrobutirina y S-(2-aminovinil)D-cisteína, producidos por mecanismos enzimáticos aún desconocidos (11).

En nuestro laboratorio hemos encontrado que los dos isomorfos de la hormona hiperglicemiante de los crustáceos, HHG-I y HHG-II, obtenidos de la glándula sinusal del acocil *Procambarus bouvieri* (Ortmann), tienen el mismo peso molecular (8,388), el mismo pI (4.79), la misma composición, la misma secuencia, el mismo espectro de dicroísmo circular y la misma actividad hiperglicemiante. Sin embargo, en cromatografía líquida de alta presión (CLAP) de fase reversa su comportamiento es diferente, pues la HHG-II es más hidrofóbica en una columna μ Bondapak-Fenilo. En un mapa tríptico sólo se pudo observar que el octapéptido amino-terminal se comportaba diferente en una columna Ultrasphere-C18 según proviniera de HHG-I o de HHG-II. Sin embargo, la secuencia de ambos péptidos resultó igual en los dos isomorfos: pGlu-Val-Fen-Asp-Glu-Ala-Cis-Lis. Se pudo demostrar, por medio de dos anticuerpos específicos contra octapéptidos sintéticos, que contenían L-Fen y D-Fen respectivamente en la tercera posición, que la HHG-II contiene un residuo de D-Fen en la tercera posición de la hormona (12). Una situación semejante hemos encontrado en los dos isomorfos de la hormona inhibidora de la muda del mismo acocil (en preparación).

Recientemente, Soyez et al (13) han demostrado que los isomorfos de los péptidos hiperglicemiantes de la langosta *Homarus americanus* se diferencian por la presencia de un residuo de D-Fen en la tercera posición. Yasuda et al (14) han encontrado la misma situación en los dos isomorfos de la hormona hiperglicemiante de *Procambarus clarki*.

Por otro lado, Heck et al (15) han encontrado en el veneno de la araña *Agelenopsis aperta* dos péptidos paralizantes que bloquean canales de calcio y sensibles al voltaje, denominados omega-Aga IVB y omega-Aga IVC, cuya única diferencia radica en que el primero contiene una D-Ser en la posición 46. Una enzima purificada del veneno de esta araña es responsable de la isomerización (reversible) de la serina-46.

Como todos los péptidos descritos hasta aquí son de síntesis ribosomal y en algunos casos se ha podido

demostrar que el codón corresponde a un L-aminoácido, es obvio que se trata de un nuevo tipo de modificación postraduccional efectuado por una o varias enzimas, que actuarían sobre el péptido realizando la estereoinversión a nivel del carbono α por medio de una secuencia de deshidrogenación seguida de una hidrogenación estereoespecífica y un mecanismo de dos bases (Fig 1). Se trataría pues de una peptidil-aminoacil-L-D-isomerasa (o α -epimerasa).

En general, podría considerarse la estereoinversión de un L-aminoácido a un D-aminoácido como un proceso de activación, porque los péptidos con la forma L son menos activos o completamente inactivos. Sin embargo, existen excepciones a esta aseveración: 1) el decapeptido sintético *Mytilus*-FFRF-amida que contiene L-Leu es casi igualmente potente en un bioensayo *in vitro* que el decapeptido natural que contiene D-Leu en la misma posición (10); 2) las hormonas hiperglicemiantes de los crustáceos, en las que ambos isomorfos son activos (12 a 14); 3) los péptidos antibacterianos y hemolíticos de *Bombina variegata* cuyos dos isomorfos también son activos (7).

Otra observación general es que la estereoinversión de un solo residuo de aminoácido en un péptido incluye a la segunda posición y puede afectar a cualquiera de los siguientes aminoácidos: Fen, Ala, Met, Asn, Ile y Leu. Sin embargo, en el caso de las hormonas hiperglicemiantes de los crustáceos, el residuo afectado es el tercero y hasta ahora sólo Fen ha sido el residuo modificado (12 a 14). El único caso conocido de una estereoinversión cercana al extremo carboxilo lo constituye la Ser-46 de la toxina de la araña *Agelenopsis aperta* (15).

Llama la atención la especificidad de esta estereoinversión, ya que el péptido modificado puede contener en su secuencia varios residuos del mismo aminoácido y, sin embargo, sólo uno de ellos

es reconocido por la enzima. Esto podría indicar que hay una secuencia vecina necesaria para el reconocimiento o que hay una estructura espacial requerida para la interacción enzima-sustrato. Hasta ahora no se ha encontrado ninguna regularidad con respecto a las secuencias vecinas al aminoácido modificado.

En cuanto al tamaño de los péptidos que han sufrido la estereoinversión, pueden ser tan pequeños como el tetrapéptido achatina-I del caracol *Achatina fulica* o tan grandes como la hormona hiperglicemiante del crustáceo mexicano *Procambarus bouvieri* (72 residuos, 8,388 Da).

No debe confundirse el proceso de α -epimerización enzimática que estamos describiendo con la racemización espontánea que ocurre en las proteínas de larga vida en tejidos peculiares como el cristalino y el esmalte dental, en los cuales puede observarse la acumulación de D-Asp y de D-Ser en el curso de la vida del individuo. La racemización del Asp ha sido observada también en las proteínas de las bacterias termofílicas. Otro caso de racemización es la acumulación de D-Asp en la proteína tau anormal del cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

La modificación enzimática postraduccional que convierte a un residuo de L-aminoácido, ya incorporado a un péptido de síntesis ribosomal, en su correspondiente D-aminoácido, no parece ser ya un fenómeno raro y probablemente tenga un significado biológico aún no identificado pero que debe ser explorado a nivel de órganos y receptores. Quedan muchas preguntas por contestar: ¿Existe acaso una enzima específica para cada residuo de aminoácido? ¿Existe una enzima específica para cada péptido? ¿Cuál es el propósito de tener dos isomorfos del mismo péptido? ¿Tendrá el isomorfo D funciones específicas? ¿Tendrá que ver el isomorfo D con mayor resistencia a la degradación y por lo tanto

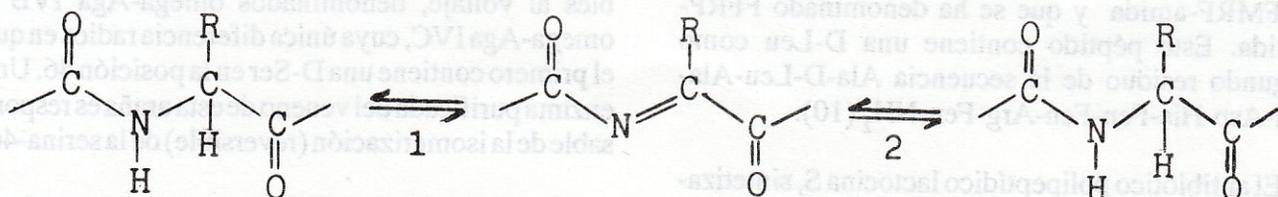


Figura 1. Esquema posible de la α -epimerización de un L-aminoácido incorporado a un péptido. 1) Deshidrogenación del residuo L. 2) Hidrogenación estereoespecífica y conversión a un residuo D.

mayor estabilidad? La respuesta a éstas y otras muchas preguntas aclararán en el futuro tanto el mecanismo como la función de esta isomerización.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece el apoyo brindado por el CONACyT y por la Fundación México-Estados Unidos para la Ciencia para la realización de este trabajo.

GLOSARIO

Isomería. Propiedad de las moléculas que tienen idéntica composición química y peso molecular, pero con estructura interna o configuración diferente.

Estereoisómeros. Moléculas que tienen composición química, peso molecular y estructura idénticos, pero que difieren en su configuración (disposición de los átomos en el espacio). Manifiestan las mismas reacciones químicas pero difieren en algunas propiedades físicas.

Isomería óptica. Estereoisomería que abarca la disposición de sustituyentes alrededor de uno o más átomos asimétricos de carbono, de modo que hay una diferencia en el comportamiento de los diversos isómeros en cuanto al grado de su rotación del plano de luz polarizada.

Tautómeros. Sustancia pura que se comporta químicamente como si tuviera dos o más estructuras diferentes que corresponden a posiciones relativas distintas de por lo menos un átomo (pej, la tautomería

ceto-enol de los aldehídos y lactama-lactima de las amidas de los ácidos carboxílicos).

Enantiomorfos. Moléculas que existen en dos formas no superponibles sobre su imagen en espejo (como las manos derecha e izquierda). Muestran actividad óptica y aparecen en pares ya que para cada compuesto ópticamente activo debe corresponder su antípoda óptica (p ej, el ácido d-tartárico y el ácido l-tartárico). Ambos enantiomorfos rotan por igual el plano de la luz polarizada pero en direcciones opuestas. También llamados enantiómeros.

Diastereoisómeros. Isómeros ópticamente activos que no son imágenes en espejo, es decir, no enantiomorfos (p ej, glucosa y galactosa). También llamados diastereómeros.

Quiralidad. Propiedad de no identidad de un objeto con su imagen en espejo (p ej, los estereoisómeros L- y D-aminoácidos).

Epímero. Una de dos moléculas que sólo difieren en su disposición espacial alrededor de un solo átomo de carbono asimétrico (p ej, L-alanina y D-alanina). Epimerasa es la enzima que efectúa la transformación de un epímero en otro o epimerización.

Racémico. Mezcla ópticamente inactiva, compuesta por igual número de sustancias dextrorrotatorias y levorrotatorias que son separables. Las racemasas efectúan esta transformación o racemización.

REFERENCIAS

1. Kleinkauf H y von Döhren H (1990) Non ribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem* 192:1-15.
2. Montecucchi P C, De Castiglione R, Piani S, Gozzini L y Erspamer V (1981) Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Peptide Prot Res* 17:275-283.
3. Richter K, Egger R y Kreil G (1987) D-alanine in the frog skin peptide dermorphin is derived from L-alanine in the precursor. *Science* 238:200-202.
4. Erspamer V, Melchiorri P, Falconieri-Erspamer G, Negri L, Corsi R, Severini C, Barra D, Simmaco M y Kreil G (1989) Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for δ opioid binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5188-5192.
5. Daly J M, Caceres J, Momi R W, Gusovsky F, Moos M Jr, Seamon K B, Milton K y Myers C W (1992) Frog secretion and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10960-10963.
6. Barra D, Mignona G, Simmaco M, Pucci P, Severini C, Falconieri-Erspamer G, Negri L y Erspamer V (1994) [D-Leu²]deltorphin, a 17 amino acid opioid peptide from the skin of the Brazilian hyliid frog, *Phyllomedusa burmeisteri*. *Peptides* 15:199-202.

7. Mignona G, Simmaco M, Kreil G y Barra D (1993) Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO J* 12:4829-4832.
8. Kamatani Y, Minakata H, Kenny P T M, Iwashita T, Watanabe K, Funase K, Sun X P, Yongsiri A, Kim K H, Novales-Li P, Novales E T, Kanafi C G, Takeuchi H y Nomoto K (1989) Achatin-I, an endogenous neuroexcitatory tetrapeptide from *Achatina fulica* Férussac containing a D-amino acid residue. *Biochim Biophys Res Commun* 160:1015-1020.
9. Ohta N, Kubata I, Takao T, Shimonishi Y, Yasuda-Kamatani Y, Minakata H, Nomoto K, Muneoka Y y Kobayashi M (1991) Fulicin, a novel neuropeptide containing a D-amino acid residue isolated from the ganglia of *Achatina fulica*. *Biochem Biophys Res Commun* 178:486-493.
10. Fujisawa Y, Ikeda T, Nomoto K, Yasuda-Kamatani Y, Minakata H, Kenny P T M, Kubota I y Muneoka Y (1992) The FMRFamide-related decapeptide of *Mytilus* contains a D-amino acid residue. *Comp Biochem Physiol C* 102:91-95.
11. Skaugen M, Nissen-Meyer J, Jung G, Stevanovic S, Sleiten K, Abildgaard C I M y Ness I F (1994) In vivo conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide. *J Biol Chem* 269:27183-27185.
12. Aguilar MB, Soyez D, Falchetto R, Arnott D, Shabanowitz J, Hunt D F y Huberman A (1995) Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): presence of a D-amino acid. *Peptides* 16:1375-1383.
13. Soyez D, Van Herp F, Rossier J, Le Caer J-P, Tensen C P y Lafont R (1994) Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. *J Biol Chem* 269:18295-18298.
14. Yasuda A, Yasuda Y, Fujita T y Naya Y (1994) Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse function. *Gen Comp Endocrinol* 95:387-398.
15. Heck SD, Siok Ch J, Krapcho K J, Kelbaugh P R, Thadeio P F, Welch M J, Williams R D, Ganong A H, Kelly M E, Lanzatti A J, Gray W R, Phillips D, Parks T N, Jackson H, Ahljanian M K, Saccomano N A y Volkmann R A (1994) Functional consequences of post-translational isomerization of Ser⁶⁶ in a calcium channel toxin. *Science* 266:1065-1068.

REFERENCIAS

1. Kleinman H y von Doern H (1990) Peptide hormones: synthesis of peptide hormones. *Bur J Biochem* 102:1-12.
2. Montecchi P C, De Castiglione R, Fiani S, Gozzini I, Espartero V (1981) Amino acid composition and sequence of bombinin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Ptychocheilus surinamensis*. *Int J Peptide Res* 17:273-282.
3. Richter K, Eggert R y Kreil G (1987) D-alanine in the frog skin-peptide bombinin is derived from L-alanine in the precursor. *Science* 238:500-502.
4. Espartero V, Melchiorri F, Falconieri-Espamer G, Negh J, Cori R, Severini C, Barra D, Simmaco M y Kreil G (1989) Deltorphin, a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for δ opioid binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5188-5192.
5. Daly JM, Casare J, Moll R W, Gnanapavan S, Mous M J, Seamon K B, Milton K y Myers C W (1992) Frog secretion and binding magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10960-10963.
6. Barra D, Mignona G, Simmaco M, Fucci F, Severini C, Falconieri-Espamer G, Negh J y Espartero V (1994) [D-Leu¹]deltorphin, a 17 amino acid opioid peptide from the skin of the Brazilian hybrid frog *Ptychocheilus surinamensis*. *Peptides* 15:199-202.

LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA COMO UNA HERRAMIENTA MAS EN EL LABORATORIO

La electroforesis para la separación de proteínas fue usada por primera vez en el año de 1937 por el bioquímico sueco Arne Tiselius (1902 a 1971) premio Nobel de química en 1948.

La palabra electroforesis, proviene de los términos griegos *electro* que significa electrón y *phoresis* que quiere decir traslación. La electroforesis se utiliza para lograr la separación de moléculas al paso de una corriente eléctrica continua y para lograr la migración y separación de moléculas, al aplicar un campo eléctrico. La separación se basa en la carga neta y la densidad de carga de cada molécula. Las que tienen carga neta positiva migran hacia el cátodo y las que tienen carga neta negativa migran hacia el ánodo; de aquí que la migración neta sea directamente proporcional a la densidad de carga de la molécula.

La matriz es un soporte que puede ser de papel como el acetato de celulosa o papel filtro, de agarosa o de poliacrilamida. Esta matriz permite a las moléculas migrar con una resolución que dependerá del tamaño del poro, esto permite separar moléculas de menos de 5 kDa como los aminoácidos y los péptidos pequeños; la matriz de agarosa es utilizada para separar moléculas con masa molecular mayor de 200 kDa o bien la matriz de poliacrilamida sirve para separar moléculas de 5 a 200 kDa.

En lo sucesivo se hará referencia únicamente a la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en la cual el soporte es una malla formada por la acrilamida que es un monómero activo y la N,N'-metilenbisacrilamida como enlazante transversal. Esta polimerización es inducida por los radicales libres que resultan de la descomposición química del persulfato de amonio, como se indica en la siguiente reacción:



Los radicales libres son estabilizados por el N,N,N',N', tetrametiletilendiamino (TEMED).

El tamaño del poro de la matriz se obtiene por modificación de la proporción de radicales libres y el grado de entrecruzamiento de la acrilamida. Las concentraciones usadas de acrilamida están comprendidas entre 3 y 15%, mezcladas con una cantidad constante de N,N'-metilenbisacrilamida al 5%. Mientras más alta es la concentración de acrilamida en el gel, la malla que se forme será más cerrada y dejará pasar las moléculas pequeñas y retendrá las moléculas grandes. Por el contrario, si la concentración de acrilamida es baja, la malla es más abierta y deja pasar a las moléculas grandes (Voet D y Voet G (1990) *Biochemistry*. Capítulo V Techniques of protein purification. John Wiley and Sons Ltd, New York, NY, USA, pp 75-99)

Existen geles en condiciones desnaturizantes y en condiciones nativas. Un gel en condiciones desnaturizantes, es aquel en que a la muestra se agrega un reductor, como el β -mercaptoetanol o el ditioneitol (DTT). Tanto los amortiguadores, como la mezcla de la poliacrilamida, contienen el detergente aniónico, dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual confiere carga negativa suficiente a la macromolécula fragmentada por ebullición. Se considera que se trata de un gel en condiciones nativas cuando las muestras no son tratadas con el reductor, ni con el SDS y no son fragmentadas por ebullición.

Las proteínas que contienen SDS aparentemente se separan en orden de su masa molecular, porque el efecto del gel es la filtración. La movilidad relativa de las proteínas en el gel varía linealmente con el logaritmo de su masa molecular (cita anterior).

La desnaturización se incrementa con la temperatura; lo cual permite que el SDS interaccione generalmente a razón de una molécula del detergen-

te por cada dos residuos de aminoácidos, lo que resulta en que todas las proteínas tienen la misma densidad de carga y la carga neta es proporcional a la masa molecular. En las muestras en condiciones desnaturalizantes, el tratamiento del SDS permite romper las interacciones no covalentes con la formación de las unidades monoméricas correspondientes. Sin embargo, las subunidades están unidas por puentes disulfuro los cuales son reducidos por el β -mercaptoetanol o por el DTT. En condiciones nativas las muestras permanecen sin estos cambios.

En lo que respecta a la cámara de electroforesis (Fig 1), ésta tiene aditamentos para obtener geles de poli(acrilamida) ya sea en placa, tubo, segunda dimensión, preparativos o en gradiente. Hay cámaras que también tienen aditamentos para geles de agarosa usados para separar ácidos nucleicos.

Para el montaje de la cámara se requiere:

1) que las placas estén en buen estado y se limpien con algodón humedecido en alcohol.

2) a los separadores que van entre las placas se les aplica vaselina a lo largo del borde externo para

asegurar la hermeticidad. Se debe evitar que la vaselina llegue al borde interno para que no contamine al gel.

3) Las placas de vidrio se ajustan paralelamente con los separadores a cada extremo (izquierda a derecha) presionando de manera uniforme con las pinzas respectivas; posteriormente se procede al montaje de este sistema de placas sobre la base del equipo. En este punto es importante revisar que el sistema no presente fugas.

Para preparar el gel se necesita de una placa de electroforesis, que está formada por dos geles de poli(acrilamida): el gel separador y el gel concentrador.

Para formar el gel es necesario usar diferentes soluciones que se preparan como se resume a continuación (Laemmli U K (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 22: 680-685).

Solución A:

Bis-acrilamida al 0.8 % y acrilamida al 30% en agua bidestilada. Se filtra en papel y se guarda a 4°C; se

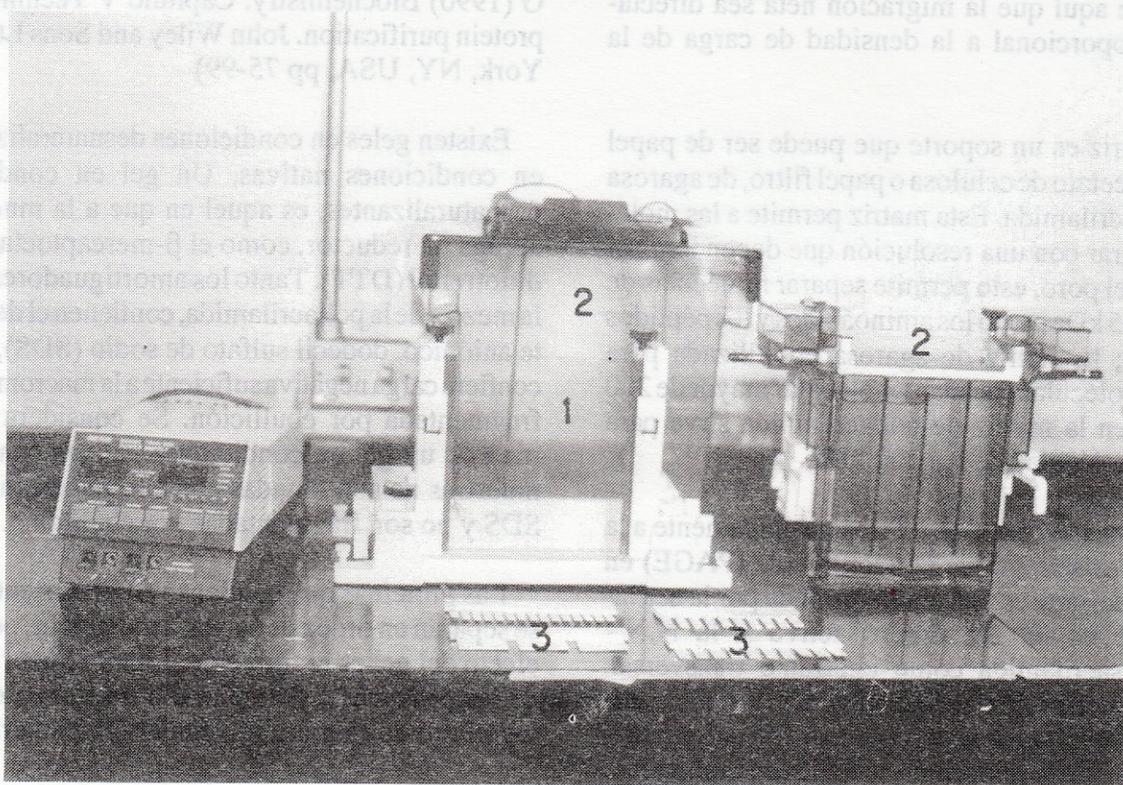


Figura 1. Se ilustra la cámara de electroforesis "Protean II xi cell", con sus aditamentos: 1) las placas de vidrio; 2) la cámara donde van sumergidas las placas; 3) los peines que dan los moldes para formar los pozos. Los aditamentos son exclusivos de cada modelo de cámara y no son intercambiables.

recomienda que se emplee dentro de un período no mayor a 4 semanas. Es altamente neurotóxica, por lo cual se usan guantes para pesarla.

Solución B:

Trizma-HCl 1.5 M, a un pH de 8.8 que se guarda a 4°C. Se recomienda ocuparse en un período no mayor a 4 semanas.

Solución C:

SDS al 10% en agua bidestilada. Cuando se pesa es recomendable taparse la nariz y la boca con un cubrebocas, porque el reactivo consiste en un polvo muy fino por lo que se puede aspirar fácilmente. Se guarda a temperatura ambiente.

Solución D:

Trizma-HCl 0.5 M, a un pH de 6.8. Se guarda a 4°C. Es estable durante 4 semanas.

Solución E:

Persulfato de amonio al 1% en agua bidestilada, no es estable, por lo que se prepara inmediatamente antes de usarlo y sólo la cantidad a emplear.

Solución F:

El TEMED se ocupa directamente del frasco, que se mantiene en hielo.

Solución fijadora:

Metanol 40% y ácido acético al 10%.

Solución para desteñir de bajo metanol:

Metanol al 30% y ácido acético al 7.5%

Solución de tinción:

Azul de coomassie R-250 al 0.2% disuelto en metanol al 50% (después de disolverlo se filtra a través de papel filtro), se agregan 7 ml de ácido acético por cada 100 ml. Tiene una sensibilidad de 0.1 a 1 µg.

Solución para desteñir de alto metanol:

Metanol al 50% y ácido acético al 7.5%.

Amortiguador para la cámara:

Para prepararla se utilizan 10 ml de la solución C, 14.4 g de glicina, 3.0 g de Trizma-HCl y se afora a un litro con agua bidestilada (el pH obtenido debe ser de 8.3). Este amortiguador se utiliza para los

reservorios superior e inferior de la cámara. Sirve para cerrar el circuito eléctrico del sistema.

En lo que respecta al amortiguador para la muestra, éste está formado por: 5.0 ml de glicerol, 2.5 ml de solución D, 1.0 ml de solución C, 100 µl de β-mercaptoetanol y 0.1 mg de colorante como pironina o azul de bromofenol, se afora a 10 ml con agua bidestilada. Esta solución se mantiene en una relación 1:4 (amortiguador:muestra). Debido a que la muestra puede flotar y perderse al ser colocada en los pozos del gel se necesita de este amortiguador el cual aumenta la densidad de la muestra.

También se necesita de un gel concentrador, que es de baja resistencia, al 3% de poli(acrilamida), que permite que las diferentes moléculas contenidas en las muestras por analizar lleguen todas al mismo tiempo al límite con el gel separador. El gel concentrador se prepara con: 5.7 ml de agua bidestilada, 2.5 ml de solución D, 1.0 ml de solución A, 0.1 ml de solución C, 0.7 ml de solución E, se desgasifica durante 10 minutos y se le añaden 0.010 ml de solución F. Se homogeniza por agitación y rápidamente se vacía en el espacio que queda entre las placas de vidrio. Se coloca de inmediato el peine para que se formen los pozos, donde serán aplicadas las muestras. Una vez polimerizado el gel (aproximadamente después de 10 minutos) se retira el peine se lavan los pozos formados con amortiguador para la cámara.

También se requiere de un gel separador, que se prepara de acuerdo con las siguientes consideraciones: 1) Si las macromoléculas a separar son de un peso molecular de 45 a 200 kDa, la malla del gel debe ser grande, porque el poro así formado deja pasar las moléculas. En este caso se opta por una concentración de acrilamida de entre 5 y 7%. 2) Si por el contrario la muestra contiene macromoléculas de un peso molecular menor de 6.5 a 200 kDa, entonces se debe elegir un gel entre 10 y 15% de acrilamida para que el tamaño del poro sea menor. La concentración de este gel debe ser siempre más alta que la del gel concentrador, porque el papel del gel separador es segregar las proteínas en función de su peso molecular; lo que se traduce en diferentes distancias de migración. Se debe marcar el límite de la altura del gel separador con una raya a un centímetro por abajo del nivel inferior del diente del peine.

Si se considera una cámara con una capacidad de 40 ml (Fig 1), la preparación del gel separador al 10%, que para facilitar su manejo se hace en un matraz Kitasato, estará formada por los volúmenes de las soluciones anteriores, en la siguiente proporción: 13.4 ml de agua bidestilada, 10 ml de solución B, 13.3 ml de solución A, 0.4 ml de solución C, 2.9 ml de solución E. En seguida se desgasifica la mezcla durante 10 minutos y se agregan 0.02 ml de solución F. La razón por la cual se desgasifica antes de agregarle la solución F es para evitar que queden burbujas incluidas en el gel.

En caso de que se necesite usar un tamaño de poro diferente al que se produce con la concentración de 10% en el gel separador, la cantidad de la solución A y del agua bidestilada son las que se varían.

Una vez que se adiciona la solución F, la polimerización empieza en cuestión de segundos por lo que es indispensable agregar el gel a la cámara inmediatamente, para lograr que la malla quede distribuida en forma homogénea. El gel se vacía con ayuda de una pipeta Pasteur o de un embudo con tallo angosto, se resbala la solución por la placa de vidrio, hasta llegar a la marca que se puso anteriormente. Después de lo cual se agrega con mucho cuidado isopropanol, con el fin de que la superficie del gel quede homogénea y se evite el contacto con el aire. Es muy importante no mover las placas de vidrio hasta que transcurra el tiempo necesario para la polimerización que aproximadamente es de 30 minutos.

Cuando el gel ha polimerizado se retira el isopropanol y con mucho cuidado de no tocar la superficie del gel se limpia el exceso con papel filtro. Mientras el gel separador polimeriza se prepara el gel concentrador. Posteriormente el juego de placas de vidrio se coloca en la cámara, a la cual previamente se le ha puesto el amortiguador correspondiente. Una vez colocadas se agrega el amortiguador en el recipiente superior. Todo está listo para aplicar las muestras con ayuda de una microjeringa; se debe tener la precaución de no picar el gel con la punta de la aguja. La concentración de proteínas que contenga la muestra debe ser de entre 10 y 50 μg , la cual previamente se determina por algún método para proteínas. Para el volumen de la muestra es importante considerar el tipo de cámara por la capacidad del pozo.

Una vez aplicada la muestra en el gel, se tapa la cámara y se conectan los electrodos a la fuente de poder, se selecciona una intensidad de corriente por placa de gel de 25 mA mientras la muestra se encuentra en el gel condensador y de 35 mA cuando la muestra pasa al gel separador. Se recomienda dejar un pozo para poner la mezcla de los marcadores de peso molecular, que sirven como referencia.

Se debe estar pendiente del avance del frente del gel el cual es aparente por el colorante contenido en el amortiguador para muestra y se suspende la corriente a 1 cm de distancia del final del gel. Con guantes, se desmontan con cuidado las placas de vidrio que contienen el gel, el cual es separado en un recipiente con agua bidestilada, se pone una marca en la parte inferior derecha para saber la orientación del orden en que se encuentran las muestras.

De no teñirse en ese momento, se fijan las proteínas del gel mediante la incubación en solución fijadora durante 30 minutos. De esta manera se guarda hasta que se pueda teñir.

El gel a teñir se deja en agitación constante durante 1 o 2 horas y pasado este tiempo se empieza a desteñir. Se hacen varios cambios con la solución de bajo metanol hasta que queden sólo las bandas de proteínas teñidas. Cuando se requiere visualizar las bandas de proteínas en menos tiempo se ocupa una solución de metanol alto.

Para el análisis de la muestra es necesario conocer la concentración de proteínas. Se empleará de muestra un volumen (de acuerdo a la capacidad del pozo) cuya concentración sea de 25 a 50 μg y un volumen de marcador de peso molecular a una concentración de 1 a 5 μg que bajo condiciones desnaturizantes se hierve en baño María durante 3 minutos, mientras que en condiciones nativas no se realiza este tratamiento, aunque se mezcle con el amortiguador de muestra en la misma proporción 1:4, excepto porque éste no contiene solución C y el reductor como el β -mercaptoetanol, para mantenerlas en condiciones naturales.

Es posible conocer el peso molecular de los componentes de las muestras, por medio del cálculo de la movilidad relativa (R_f o factor de retardo).

Existe la posibilidad de tener una identificación más específica de una proteína cuando del gel de acrilamida se hace una transferencia a papel de nitrocelulosa para realizar una reacción antígeno-anticuerpo sin tener la interferencia del gel de acrilamida. Se puede aislar una proteína del gel de acrilamida por medio de una electroelución.

Las cámaras de electroforesis tienen aditamentos como para hacer geles en tubo, si se desea pueden ocuparse para un gel en segunda dimensión, para que los componentes que tengan la misma distancia de migración pero diferente composición molecular, se puedan separar mejor. A este sistema se le llama Isoelectroenfoque.

Cuando en el protocolo de experimentación se manejan muestras radiactivas es posible detectar las proteínas al deshidratar el gel y ponerlo en contacto con una placa de rayos X durante horas o días, según la concentración de radiactividad de las muestras, a menos 70°C, después de lo cual se revela la placa y se obtienen las bandas de las proteínas marcadas.

Cuando por la sensibilidad de la tinción con coomassie no se detectan las proteínas es recomendable usar la tinción de plata que tiene una sensibilidad de 2 a 10 ng/ banda.

Existen algunas características de esta técnica que se pueden considerar como desventajas. Entre ellas se han mencionado: la necesidad de una fuente de corriente eléctrica continua. El tiempo para tener resultados, que en algunas ocasiones es de dos días. Si la muestra se desnaturaliza, la proteína pierde su actividad durante el proceso aun en condiciones nativas. La recuperación por electroelución diluye la muestra.

La autora agradece al Dr Edmundo Calva Cuadrilla por su disponibilidad y recomendaciones en la revisión de esta nota.

Margarita M Rosas Flores
 Departamento de Bioquímica
 Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
 Instituto Politécnico Nacional

EL PLOMO: ¿UNA SUBSTANCIA UTIL O UN VENENO?

Hasta hace poco el interés por el medio ambiente era considerado por muchos una manía o una simple moda; la acción humana sobre el ambiente sólo era una preocupación para unos cuantos observadores de pájaros, pescadores de truchas, escritores y científicos. Sin embargo, en la actualidad esto ha cambiado; el común de la gente comienza a tomar conciencia del problema de la contaminación y por ende, existe una preocupación creciente sobre el impacto destructivo que tiene sobre nuestro entorno. Dentro de este contexto, la contaminación con plomo es de las más conocidas, debido a lo cotidiano que puede resultar en las grandes urbes, como es el caso de la ciudad de México.

El plomo es un elemento tóxico, pero ¿hasta qué punto los problemas de salud pública que genera dependen del uso y manejo que se le da? y ¿por qué es tan ampliamente utilizado?

Con el fin de contestar las preguntas anteriores es importante conocer sus "intimidades" químicas. El plomo tiene como símbolo químico Pb, es un elemento localizado en el grupo IV de la tabla periódica con número atómico 82; masa atómica 207.19, un punto de fusión de 327.4°C y un punto de ebullición de 1,620.0°C. El plomo puede existir en dos estados de oxidación, Pb(II) y Pb(IV). Es un metal blando, brillante, blanco azulado, maleable, soluble en ácidos y de fácil oxidación.

El plomo no existe en la naturaleza en estado nativo, pero sí combinado con numerosos elementos tales como los halógenos, oxígeno, azufre y carbono, y es debido a esta capacidad de formar una amplia gama de compuestos que se emplea frecuentemente en la industria. El plomo no tiene ningún papel fisiológico dentro de los organismos, sin embargo, el ion Pb^{2+} puede generar numerosos complejos con iones, interfiere en funciones en las que participan el calcio, el zinc, el cobre y el fósforo; así mismo interactúa con proteínas y membranas de las células, donde altera la estruc-

tura y funcionalidad de las mismas y por lo tanto del organismo en general.

Ahora bien, una vez señaladas las características del "enemigo", cabe destacar que la utilización del plomo por el hombre data de mucho tiempo atrás; fue empleado en las civilizaciones babilónica y romana como material de construcción y en conductos de agua. Los árabes y romanos lo obtenían de las célebres minas españolas de Linares y la Carolina, en Jaén. En la Edad Media fue aplicado en el techado de las catedrales y en los vitrales. Su producción se acentuó en el siglo XIX al incrementar sus usos industriales y compartió la hegemonía del hierro en el inicio del siglo XX.

En la segunda mitad del presente siglo, la irrupción de los metales ligeros y resistentes como el titanio inició la decadencia en la industria del plomo; sin embargo, en la actualidad continúa empleándose a gran escala en la industria. Entre los países que industrializan el plomo a nivel mundial se encuentran, Estados Unidos de América, China, Australia, Japón, México, Alemania y el Reino Unido. Los mayores yacimientos se encuentran en Estados Unidos de América, Canadá, México, Perú, Bulgaria, Marruecos, España y en las anteriormente llamadas URSS y Yugoslavia. Las principales menas de plomo son la *cerusita*, en forma de carbonato; la *anglesita* o sulfato de plomo y la *galena*, sulfuro de plomo encontrado junto a minerales de plata; el método más utilizado en la obtención del plomo es el tratamiento químico de la galena.

En cuanto a sus aplicaciones; el plomo se emplea debido a su resistencia a la corrosión en techados, revestimientos de tinajas y recipientes industriales; así mismo en fusibles para instalaciones eléctricas y calderas de vapor; se utiliza en pantallas y muros de protección para radiología, dada su opacidad a los rayos X y gamma; es útil en las instalaciones atómicas, así como para envasar elementos dotados de radiactividad natural y artificial.

Muchas y muy importantes son las aleaciones del plomo con otros metales que aumentan su dureza: con el antimonio forma metales útiles en la fabricación de tipos de imprenta, placas de acumuladores eléctricos, etc; con el arsénico, municiones para la caza; con el estaño y cobre, el plomo forma metales antifricción.

Entre los compuestos organometálicos que forma se encuentra el tetraetilo de plomo, empleado como antidetonante, muy eficaz en la gasolina, pero debido a su toxicidad, en muchos países se ha estipulado una concentración máxima, con el objeto de limitar el peligro que representa su presencia en los gases del escape de los automotores de combustión interna. Pero la lista de usos y aplicaciones del plomo es interminable, dado que en industrias como la farmacéutica, la cosmética y la de alimentos, es común emplear compuestos que contienen plomo.

Es evidente que podemos encontrar fácilmente plomo en gran parte de los objetos que utilizamos a diario y no sólo en desechos residuales en el medio ambiente. Esto significa que nos encontramos expuestos a cantidades suficientes de plomo para producir una intoxicación, pero ¿qué tanto puede repercutir una exposición al plomo de esta naturaleza en nuestra salud?

Por estudios realizados en algunas poblaciones se sabe que el plomo afecta principalmente a los sistemas sanguíneo, nervioso, gastrointestinal y renal. Los efectos causados por el plomo se clasifican en agudos y crónicos de acuerdo al tiempo, grado de exposición e intensidad del daño (Frieberg L, Worgerg G F y Vouk ? (1986) *Lead Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier Science Publishers, pp 298-353).

De acuerdo con lo anterior, si bien el plomo es un elemento tóxico para los organismos vivos, ha sido

también un elemento de gran utilidad al sector industrial y en especial a la metalurgia por sus bajos costos de inversión, lo que ha repercutido en la evolución industrial y tecnológica en la fabricación de satisfactores para la población.

Pero, ¿estamos dispuestos a seguir pagando el precio de las ventajas que obtenemos con su empleo? o ¿es tiempo de actuar y buscar un cambio? por ejemplo, mediante la síntesis de compuestos nuevos que sean de utilidad en industrias donde actualmente es indispensable el empleo del plomo y cuyo impacto ecológico, por lo menos, no sea tan grave; a la vez de tratar si no de revertir los efectos que puede tener el plomo, sí de detenerlos, al establecer medidas de control en su emisión al ambiente y prevenir la intoxicación por el mismo en poblaciones de alto riesgo. En este sentido, varios países han buscado la sustitución del plomo por otros materiales como el aluminio, pero éstos representan un mayor gasto de recursos monetarios en la producción. En nuestro país, en los últimos años se ha hecho investigación en este campo, por ejemplo en aleaciones a base de plomo para el mejoramiento de rejillas de baterías o pilas automotrices, donde todos sus componentes son reciclables. En la intoxicación por plomo y los daños que ésta puede generar, se han estudiado los mecanismos de toxicidad para tratar de detectar el problema de manera temprana, así como la posible terapéutica a emplear.

Sin embargo aún queda mucho por hacer, ya que en conjunto los aspectos anteriores hacen de la contaminación con plomo un problema complejo, no sólo químico, sino social y económico, donde participa la población en todos sus niveles y por ende no fácil de resolver.

Martha Angélica Quintanar Escorza

Departamento de Bioquímica

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

Instituto Politécnico Nacional

EL CICLO CELULAR Y LA DUPLICACION DEL MATERIAL GENETICO: LA EVOLUCION DE UN CONCEPTO

En fechas recientes se han logrado cristalizar las proteínas cinasas que controlan el ciclo celular (De Bond H L, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones H D, Morgan D O y Kim S H (1993), *Nature* 363:595-602 y Jeffrey P D, Russo A A, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J y Pavletich N P (1995) *Nature* 376:313-320). Estos estudios son un reflejo de la precisión con la que se puede comprender un proceso biológico. El camino hacia estos avances se inició en el siglo pasado con la postulación de la Teoría celular. Esta es una breve reseña histórica de la evolución del concepto de que la división celular está acoplada a la duplicación del material genético.

La Teoría celular constituye uno de los principios más importantes en la Biología, dos de sus postulados son: 1) todos los seres, animales, plantas y bacterias, están formados por células y productos celulares, y 2) las nuevas células se forman siempre por división de células preexistentes. El estudio del ciclo celular representa el deseo de comprender y dar orden a los fenómenos que dan apoyo al segundo postulado de la Teoría celular, esto es el mecanismo de división celular y su regulación.

El mejoramiento del microscopio realizado por Antony van Leeuwenhoek (1632 a 1723), durante la segunda década del Siglo XVIII y la observación cuidadosa de un gran número de tejidos de plantas y animales, así como de organismos unicelulares, dieron origen a las primeras contribuciones que llevarían al desarrollo de la Teoría celular. Ya para 1809 la imagen de las células como las unidades estructurales y funcionales de los organismos fue reconocida, como lo demuestra la siguiente cita del naturalista francés Jean Baptiste De Mont caballero de Lamarck (1744 a 1829): “ningún cuerpo puede tener vida si sus partes constitutivas no son tejido celular o están formadas por tejido celular”. Incluso el papel central que tiene la división celular como la base del crecimiento de un tejido y finalmente de un

organismo, fue conocida en 1824 por el fisiólogo francés René Joachim Henri Dutrochet (1776 a 1847) quien concluyó que “la estructura, composición y crecimiento tisular es el resultado del comportamiento y características de las células que lo constituyen”. Los estudios sobre los mecanismos que regulan el ciclo celular debieron esperar a que los fenómenos que ocurren a lo largo de éste fueran identificados y caracterizados.

Theodor Schwann (1810 a 1882) el gran naturalista alemán, postuló en 1834 que las células poseen la información necesaria para funcionar como parte de un todo. Si bien él nunca definió la naturaleza de esta información, este concepto sentó las bases para pensar que tanto la organización como el funcionamiento de un organismo son el resultado de la información contenida en cada célula. Esta idea dio mayor fortaleza a las propuestas de Lamarck de una transferencia de información heredada de una generación a otra. Aunque por mucho tiempo se desconoció la naturaleza del material hereditario, era claro que durante la división celular éste debía de pasar a cada una de las células hijas. Por una parte hubo que identificar que los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) son las moléculas que contienen esta información y que éstas se encuentran en el núcleo celular donde constituyen los cromosomas.

En 1831 se hizo el primer reporte de la presencia de un núcleo celular por el botánico inglés Robert Brown (1773 a 1858), como resultado de sus estudios microscópicos detallados de las estructuras subcelulares. Pero aún faltaba definir la presencia del material portador de las características que son transmitidas de la célula madre a las células hijas. Este concepto fue formalizado por el biólogo alemán August Weismann (1834 a 1914), en 1889 al distinguir entre un plasma germinativo al que llamó “trofoplasma” y un plasma dotado de características hereditarias al que denominó “idioplasma”. Estos

conceptos requerían de que el genético se duplicara y se separara en las células hijas de manera equitativa. Con este sencillo postulado quedaron sentadas las bases para pensar que la división celular, un proceso macromolecular, y la duplicación del material hereditario, un proceso bioquímico, debían de funcionar de manera coordinada.

Si bien los experimentos del botánico austriaco Johan Gregor Mendel (1822 a 1884), que aparecieron publicados en 1866, demostraron que la separación independiente de las unidades del material genético de una generación a otra ocurría, no fue sino hasta su redescubrimiento a principios de este siglo que pudieron ser incorporados al modelo del ciclo celular.

La identificación de los cromosomas llevó al biólogo estadounidense Walter S Sutton (1874 a 1938), a proponer en 1903 que las unidades genéticas postuladas por Mendel se encuentran en una disposición lineal dentro de la estructura del cromosoma y que su segregación ocurre durante la mitosis. En 1910 el genetista estadounidense Thomas Hunt Morgan (1866 a 1945), identificó mutaciones recesivas en *Drosophila melanogaster* que cosegregaban con los cromosomas sexuales, lo que evidenció experimentalmente la hipótesis planteada por Sutton. En 1944, Oswald Theodor Avery (1877 a 1955) y sus colaboradores con sus experimentos de transformación de bacterias no virulentas a formas virulentas, demostraron que el material genético está constituido por el ADN. Finalmente, no fue sino hasta 1951 que Howard y Pelck encontraron que la

duplicación del ADN ocurre sólo durante períodos discretos en cada ciclo celular, que corresponden a lo que ahora se denomina fase de síntesis o fase S y que ésta ocurre mucho antes de la condensación cromosómica que se lleva a cabo durante la mitosis. Es así como a mediados de este siglo quedó firmemente establecida la correlación entre la división celular y la duplicación y segregación del material genético.

Es interesante notar que la duplicación del ADN es un proceso bioquímico mientras que la duplicación de la célula y muchos otros fenómenos asociados al ciclo celular, son procesos macromoleculares. Debido al progreso de las herramientas bioquímicas no es sorprendente que durante este siglo se haya avanzado notablemente a nivel bioquímico en la comprensión de los mecanismos de regulación de ciclo por proteínas cinasas. Sin embargo, aún es poco lo que se sabe con respecto a los mecanismos celulares que controlan el tamaño de la célula, la multiplicación de los orgánulos, o la división celular. Esto se debe en parte a la falta de modelos y herramientas tecnológicas para estudiar procesos macromoleculares. A pesar de todos los esfuerzos realizados, aún es difícil comprender, hoy en día, cómo es que la célula mantiene coordinados todos estos procesos celulares con la duplicación del genoma.

Alejandro Zentella Dehesa
Departamento de Bioenergética
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

MARIETTA TUENA SANGRI: INVESTIGADORA EMERITA DEL INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR

En la sesión del 13 de Octubre de 1995, el Consejo Universitario de la Universidad Nacional Autónoma de México, puso fin al proceso que se inició con la propuesta presentada al Consejo Interno del Instituto de Fisiología Celular, por un grupo numeroso de integrantes de su personal académico y con base en el dictamen favorable de la Comisión del Mérito, del propio Consejo Universitario, le confirió el nombramiento de Investigadora Emérita a Marietta Tuena Sangri de Gómez y reconoció así una obra de valía excepcional y los servicios prestados, con toda dedicación, a la Universidad por más de 30 años.

En 1960 recibió el título de Médico Cirujano de la Facultad de Medicina y en 1977 el doctorado en Bioquímica de la Facultad de Química, ambos de esta Universidad.

Su relación profesional con la Universidad, la inició en 1965 como profesora de tiempo completo de la Facultad de Medicina, posición que conservó hasta 1973 y del doctorado en Bioquímica de la Facultad de Química, nombramiento que tiene hasta la actualidad. En 1973 se incorporó como investigadora al Departamento de Biología Experimental del Instituto de Biología que, en Enero de 1979, se transformó en el Centro de Investigaciones en Fisiología Celular y más tarde, en Mayo de 1985, en el actual Instituto de Fisiología Celular, en donde participa como profesora del posgrado en Investigación Biomédica Básica de la Unidad Académica de los Ciclos Profesional

y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades.

Su primer trabajo lo publicó en 1962 en el Journal of Neurochemistry, como colaboradora de Guillermo Massieu Helguera y a partir de entonces ha acumulado, hasta 1994, una obra de más de 90 artículos formales en revistas de distribución internacional como Biochemistry, Journal of Biological Chemistry, European Journal of Biochemistry, Archives of Biochemistry and Biophysics, Biochimica et Biophysica Acta, FEBS Letters, Journal of Bioenergetics and Biomembranes, Biochemical Biophysical Research Communications, entre otras. Tales contribuciones, hasta 1992, han sido citadas en la literatura internacional 443 veces.



En colaboración con Antonio Peña Díaz y Armando Gómez Puyou, quienes también han recibido el nombramiento de eméritos, inició el estudio de los fenómenos energéticos celulares, en los que han hecho contribuciones importantes, como el demostrar que la fosforilación oxidativa se modifica por efecto de los cationes monovalentes, tanto a nivel de la cadena respiratoria como de la misma ATPsintetasa, debido a que éstos intervienen en el transporte de metabolitos a través de las membranas de las mitocondrias. En 1963 estos 3 investigadores publicaron, junto con Jesús Guzmán, su primer trabajo en el campo de la Bioenergética, en el Biochemical Pharmacology.

La importancia de su trayectoria académica ha sido reconocida por medio de su participación como investigadora visitante en varias instituciones extranjeras, como el Departamento de Bioquímica de la Johns Hopkins Medical School, en Baltimore, Maryland, EUA; el Laboratorio Arrhenius de la Universidad de Estocolmo, en Suecia; el Eidgenossische Technische Hochschule de Zurich, Suiza; el Instituto Nencki de Biología Experimental en Barsovia, Polonia; la Universidad Estadual de Campinas y la Universidad Federal de Río de Janeiro en Brasil, con la que mantiene desde hace muchos años una estrecha comunicación.

A lo largo de su carrera académica ha dirigido tesis de licenciatura, maestría, doctorado y a varios alumnos extranjeros de posdoctorado. De los muchos alumnos que han interactuado con su grupo, unos 20 siguen relacionados con labores académicas tanto de docencia como de investigación.

En 1989, compartió con Armando Gómez Puyou, el Premio Universidad Nacional Autónoma de México en el área de Investigación en Ciencias Naturales, que ahora se acompaña con la designación de investigadora emérita, con la que su Universidad le reconoce el esfuerzo, la dedicación y los logros que han sido parte integral de su trayectoria académica.

El 16 de Agosto de 1995, participó en el XXII Taller de Actualización Bioquímica, organizado por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de esta Universidad y la Escuela de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, donde se le tomó la fotografía que ilustra esta nota.

*Jesús Manuel León Cázares y
María Teresa Elizabeth Flores Rodríguez
Instituto de Fisiología Celular y
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México*

Como jefe del Departamento de Bioquímica, moderniza los programas de la asignatura, convierte los ejercicios prácticos en roles que tienen que ser resueltos por los alumnos de manera cuantitativa; publica su libro de bioquímica, que llega a ser el clásico en su género en América Latina; promueve la contratación de investigadores recién egresados y a la vez estimula a destacados estudiantes a dedicarse a la bioquímica; fomenta la enseñanza interdisciplinaria de esta ciencia con otras disciplinas como la histología, fisiología y farmacología; desa-

*Documento leído por Enrique Ffías Garza en ocasión del recibimiento del Doctor José Laguna como Socio Honorario de la Academia Nacional de Medicina el 8 de febrero de 1997.

CONTRIBUCIONES DEL DOCTOR JOSE LAGUNA A LA MEDICINA EN MEXICO*

Si pretendiéramos resumir las aportaciones más significativas del Doctor José Laguna a la medicina de nuestro país, podríamos agruparlas en cuatro grandes campos: Investigación, Educación Médica, Salud Pública y Ética. En el terreno de la investigación destacó como uno de los pioneros de la bioquímica en México tanto como investigador, pero sobre todo como promotor mediante su actuación como jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

Publica su primer artículo científico a los 20 años de edad, 2 años antes de obtener el título de médico cirujano, y se convierte en profesor de la Facultad de Medicina, unos meses después de su recepción profesional en 1943. Realiza sus estudios de posgrado en el Hospital General de la Ciudad de México, en la Universidad de Harvard, en la Universidad de Aberdeen y en el Instituto de Nutrición Animal "Rowett", también en Aberdeen, Escocia. En 1951, se hace cargo del Laboratorio de Bioquímica y Estudios Metabólicos del Hospital de Enfermedades de la Nutrición e inicia su cátedra de bioquímica en la Facultad de Medicina. En 1953, 10 años después de terminar sus estudios profesionales, ingresa a la Academia Nacional de Medicina.

Como jefe del Departamento de Bioquímica, moderniza los programas de la asignatura, convierte los ejercicios prácticos en retos que tienen que ser resueltos por los alumnos de manera cuantitativa; publica su libro de bioquímica, que llega a ser el clásico en su género en América Latina; promueve la contratación de investigadores recién repatriados y a la vez estimula a destacados estudiantes a dedicarse a la bioquímica; fomenta la enseñanza interdisciplinaria de esta ciencia con otras disciplinas como la histología, fisiología y farmacología; desa-

rolla nuevas líneas de investigación y establece el posgrado de bioquímica en asociación con el Instituto de Investigaciones Biomédicas, la Facultad de Química y el Instituto de Enfermedades de la Nutrición; gracias a sus gestiones se obtienen cuantiosos donativos internacionales y fortalece el intercambio académico con prominentes investigadores del ámbito internacional. Estas acciones fueron el preámbulo de acciones institucionales de gran envergadura como el Programa de Alta Exigencia Académica de la UNAM, el nuevo reglamento de Estudios de Posgrado de la UNAM y el programa de repatriación del CONACYT.

En el terreno de la educación médica el Maestro Laguna se ha distinguido por su firme voluntad para transformar la enseñanza y por su visión hacia el futuro en torno a las innovaciones de mayor trascendencia. Como director de la Facultad de Medicina, 1971-1975, logró el establecimiento del Programa de Medicina General Integral (Plan A-36) en el año de 1973 y más tarde, la creación del Centro Latinoamericano de Tecnología Educativa para la Salud (CLATES) en el año de 1979; ambas acciones son testimonios de la originalidad y trascendencia de su obra en este campo. El modelo de educación médica desarrollado a través del Plan A-36 representó el esfuerzo organizado más importante en nuestro país por lograr el aprendizaje integral de las ciencias básicas y las disciplinas clínicas; por un acercamiento temprano del estudiante con el enfermo, poniendo el énfasis en la prevención y el cuidado oportuno del enfermo de acuerdo a sus características biosociales. El Plan A-36 impactó significativamente los cambios curriculares de las escuelas de medicina que se crearon en esa época y de aquellas que efectuaron cambios curriculares tendientes a superar las limitaciones de la enseñanza tradicional.

El CLATES, creado en un principio con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud, y que posteriormente fue transformado en el Centro Universitario de Tecnología Educativa para la Salud

*Documento leído por Enrique Piña Garza en ocasión del recibimiento del Doctor José Laguna como Socio Honorario de la Academia Nacional de Medicina el 8 de febrero de 1995.

(CEUTES) de la UNAM, fue el primer centro de esta naturaleza en América Latina y tuvo como propósito primordial desarrollar los recursos tecnológicos necesarios para la innovación continua de la educación médica. La amplia visión de José Laguna en el campo de la docencia hizo que en fechas recientes ocupara el cargo de Coordinador de las Unidades Multidisciplinarias de la UNAM en donde impulsó con gran determinación la planeación y evaluación educativas. El reconocimiento público a sus méritos como educador cristalizaron con su designación como Maestro Emérito de la Facultad de Medicina.

Sus contribuciones a la Salud Pública se relacionan con el profundo impulso que prestó al desarrollo de la medicina familiar como una estrategia fundamental para la extensión de la cobertura. Mediante su desempeño como Subsecretario de Planeación en 1977, Subsecretario de Asistencia en 1982 y Subsecretario de Investigación y Desarrollo en 1984 cobró importancia la planeación y la evaluación de los programas de Salud.

José Laguna no escribió un libro sobre ética médica; simplemente practicó sus principios en caso necesario hasta sus últimas consecuencias; su integridad moral, honestidad y respeto por la verdad son cualidades que más de una vez le significaron problemas. Sin embargo, para quienes tuvimos el honor de trabajar a su lado, éste ha sido uno de sus legados más importantes.

La trascendencia de la vida profesional del Doctor Laguna está vinculada estrechamente a la interacción con otros ilustres médicos. No dudo en afirmar que el ejemplo de José Laguna para las actuales y futuras generaciones de médicos, se ha engrandecido gracias a su relación con ellos.

*Enrique Piña Garza
J Héctor Gutiérrez Avila
Secretaría General
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México*

JONAS EDWARD SALK 1914 A 1995

El 23 de Junio de 1995, murió Jonas Edward Salk. Según la segunda edición de la obra *Biographical Encyclopedia of Scientists* (Institute of Physics Publishing, Bristol y Philadelphia), nació en la Ciudad de Nueva York, en el estado del mismo nombre, en los Estados Unidos de América, el 28 de Octubre de 1914. En 1939 obtuvo el título de médico en la Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva York. En 1942, se trasladó a la Universidad de Michigan, donde trabajó bajo la dirección del virólogo Thomas Francis (1900 a 1969), en las investigaciones sobre la vacuna contra la influenza, hecha con base en virus inactivados con formaldehído.

En 1947 ingresó a la Universidad de Pittsburgh donde, desde 1949, tuvo el puesto de profesor de Bacteriología. En esta universidad inició el trabajo que finalmente, en 1954, lo llevó al descubrimiento de una vacuna eficiente contra la poliomielitis. Según Renato Dulbecco en su nota publicada en *Nature*, el 20 de Julio de 1995 (376:216) fue este avance, el que le permitió realizar el sueño de construir un instituto para la investigación biológica básica, separado de las universidades y dedicado al estudio de la naturaleza humana en toda su complejidad el cual, en 1963, fue invitado a dirigir. Este se construyó en La Jolla, San Diego, California y pronto se conoció como el Instituto Salk, que en poco tiempo se convirtió en uno de los centros de investigación más importantes del mundo.

Salk no fue el primero en desarrollar una vacuna contra la polio, pues en 1935 ya se había probado, en más de 10,000 niños, el uso de vacunas hechas con base en virus muertos o atenuados, que sin embargo no sólo no proporcionaron una defensa efectiva, sino que también resultaron no ser seguras y probablemente fueron las responsables de algunas muertes y de varios casos de parálisis.

A principio de la década de 1950, cuando Salk empezó sus trabajos, ya se habían logrado una serie de avances cruciales que dejaron atrás la tragedia de 1935. Así, en 1949 se demostró que existían 3 tipos

de virus de la polio, lo que hacía que una vacuna efectiva contra un tipo pidiera no serlo contra los otros dos. En ese mismo año, el microbiólogo estadounidense John Franklin Enders (1897 a 1985), de quien se dice que en el laboratorio de enfermedades infecciosas, que montó en el Hospital Infantil de Boston, "abrió una nueva época en la historia de la investigación sobre los virus", logró el cultivo del virus de la polio en tejidos embrionarios, lo que facilitó enormemente la posibilidad de disponer de éstos para las investigaciones. Esto lo llevó a la obtención, junto con sus colegas Thomas Huckle Weller (1915) y Frederick Chapman Robbins (1916), del Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1954.

Salk tuvo que desarrollar una vacuna que fuera a la vez segura y potente, para lograr garantizar su seguridad, usó virus expuestos al formaldehído por hasta 13 días y después probó su virulencia en el cerebro de monos. En teoría, esto permitió un mayor margen de seguridad, pues no se pudieron detectar virus vivos después de solamente 3 días de tratamiento. Para probar la potencia de esa vacuna, se inyectó en niños que ya tenían la parálisis y se encontró que se incrementaba el nivel de los anticuerpos correspondientes. Cuando se aclaró que los niveles altos de los anticuerpos se habían producido por la vacuna de virus muertos, Salk procedió a probarla en una vacunación masiva. Sin embargo, se manifestaron dos objeciones: la primera del microbiólogo de origen polaco Albert Bruce Sabin (1906), quien desarrolló la vacuna de virus atenuados por el cultivo del virus en tejido renal de mono y que por lo tanto opinó que las vacunas de virus muertos no eran las apropiadas; y la segunda proveniente de varios investigadores, que aseguraron que habían encontrado virus vivos en las vacunas producidas con base en virus supuestamente muertos.

No obstante tales opiniones, en 1954 Salk continuó con la prueba, en la que administró o un placebo o la vacuna de virus muertos a 1,829,916 niños. La evaluación de esta prueba se puso en manos de Thomas Francis quien en Marzo de 1955, reportó

que la vacunación había sido efectiva entre un 80 y un 90%. El 12 de Abril de 1955, se dispuso de más vacuna para uso general en los Estados Unidos de América, un país que por muchos años había sido arrasado por epidemias de polio casi cada verano, que afectaban principalmente a los niños. El anuncio de la disponibilidad de la vacuna significó que se había ganado una gran batalla y Salk se convirtió en un héroe nacional.

De inmediato, se hicieron planes para vacunar a 9 millones de niños. Sin embargo, en unas cuantas semanas, se recibieron reportes del estado de California de que los niños desarrollaban la enfermedad al poco tiempo de haber sido vacunados. Después de un período de confusión considerable, se aclaró que todos esos casos habían recibido vacunas preparadas en un mismo laboratorio, lo que hizo suponer de una falla en su elaboración. Una vez terminado el debate se decidió proceder con la vacunación y para finales de 1955 se habían administrado 7 millones de dosis.

Se hicieron nuevas mejoras a las técnicas utilizadas en el proceso de producción y las reglas de seguridad establecidas debían ser capaces de eliminar cualquier vacuna que contuviera virus vivos y en el caso de que, a pesar de las salvaguardas, un virus vivo hubiera podido sobrevivir a los tratamientos, éste haría notar su presencia mucho tiempo antes de que se usara en una vacuna.

El valor que Salk mostró al persistir con su vacuna se justificó claramente por medio de los resultados obtenidos en el período de 1956 a 1958, en el que se administraron 200 millones de dosis, sin que se produjera un solo caso de parálisis.

Según Renato Dulbecco, en la nota mencionada, el establecimiento de la epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, le dio a Salk una

nueva razón para continuar su trabajo sobre las vacunas; de nueva cuenta, fue en contra de las opiniones científicas prevalecientes, pues su idea fundamental y original fue la de usar la vacuna para tratar de mejorar las condiciones de las personas ya infectadas, lo que él llamó "una vacuna terapéutica", concepto que la mayoría de los especialistas no aceptaba. Estas investigaciones las llevó a cabo hasta el último día de su vida y antes de morir pudo ver un ligero cambio en el pensamiento científico y cierta aceptación de la vacuna que él estaba proponiendo, así como el inicio de algunas pruebas clínicas limitadas. Sin embargo, aún queda por determinarse si este tipo de enfoque fructificará.

Salk era una persona muy amable y de convicciones profundas a quien no era fácil de convencer para cambiar de actitud por opiniones ajenas; no obstante que las escuchaba, persistía en hacer aquello que pensaba que era lo correcto, aún enfrentando la oposición más fuerte. Trabajó muy duro para lograr el éxito tanto en sus investigaciones, la vacuna, como para tratar de realizar sus sueños, el Instituto Salk. Tenía una mente optimista y filosófica que reveló en especial en sus libros dedicados al destino del hombre, en donde indicó las vías para una evolución continua. Fue un médico preocupado por la salud de las personas del mundo, especialmente las de los países pobres; por ejemplo, convenció al gobierno de la India y ayudó a lograr que 22 millones de niños, que nacen en ese país cada año, recibieran la vacuna contra la polio, posiblemente como una cuarta vacuna agregada a la triple (difteria, tétanos y tosferina).

*Jesús Manuel León Cázares y
María Teresa Elizabeth Flores Rodríguez
Instituto de Fisiología Celular y
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México*

A LOS LECTORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

DONATIVO ANUAL 1996

El BEB entra en su décimo quinto año de publicación y debido a las condiciones económicas imperantes en México, nos permitimos solicitarles de la manera más atenta, el envío de un donativo extracuotas de \$ 200.00 (doscientos pesos) o bien \$20.00 US dólares, que hará posible continuar con la elaboración y distribución del volumen 15 de nuestro Boletín.

El donativo puede hacerse mediante un depósito bancario a la cuenta número **1153813-9 de Bancomer**, o de un giro bancario a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C.

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

Atentamente
El Comité Editorial

DONACIONES E INTERCAMBIOS

Por este conducto me permito enviarle una copia del mensaje que me mandaron de la Universidad de Sonora en la que se comenta sobre el recibo de la donación del Plant Physiology:

Estimable Raúl Arredondo:

Hemos recibido la colección de Plant Physiology, primero una remesa de 3 sacos con varias cajas haciendo un total de 167 ejemplares y posteriormente otra remesa de dos cajas con el resto de los ejemplares, por lo cual estamos muy agradecidos.

Me despido de usted con nuestro agradecimiento y buenos oficios para nuestra institución.

Gracias!!!!!!!!!!!!!!

Eduardo Pablo Canseco Vilchis

José Raúl Arredondo Peter

SEGUNDO SIMPOSIUM DE ALCOHOLISMO EN EL CARIBE

Este simposio se llevará a cabo en la Ciudad de Santiago de Cuba, del 12 al 15 de junio de 1996. El programa científico cultural ha sido diseñado con el objeto de promover el intercambio constante de puntos de vista y experiencias, analizar las tendencias de avances terapéutico-rehabilitatorios y delinear estrategias de desarrollo para el futuro de esta temática en la región.

La reunión está auspiciada por la Sociedad de Neurociencias de Cuba, el Ministerio de Ciencias, Tecnología y Medio Ambiente, el Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba y la Dirección Provincial de Salud Pública.

El programa científico incluirá mesas redondas, conferencias magistrales, temas en cartel, talleres y videos sobre los temas centrales que se enlista a continuación:

- Calidad de vida y alcoholismo
- Sexualidad y alcoholismo
- Alcoholismo y comunidad
- Epidemiología del alcoholismo
- Alcoholismo y costo
- Atención de enfermería y alcoholismo
- Sociología y alcoholismo
- Estudios experimentales del alcoholismo
- Clínica y alcoholismo
- Complicaciones del alcoholismo
- Medicina legal y alcoholismo
- Rehabilitación del alcoholismo
- Investigación médica sobre alcoholismo
- Nutrición y alcoholismo
- Avances en el tratamiento del alcoholismo
- Alcoholismo y stress
- Medicina tradicional, natural y alcoholismo
- Promoción y prevención del alcoholismo
- Estomatología y alcoholismo

El plazo de admisión para los resúmenes se termina el 1º de mayo de 1996.

Para mayor información dirigirse a:

Dra C M Marlen Gorget Pi. Facultad de Ciencias Médicas II. Carretera de El Caney s/n Pastorita, Santiago de Cuba, Código Postal 90400, Teléfonos 51718 y 42017 extensión 33, Télex 061254, Fax 53(226)86200 de 8 a 17 horas.
Correo electrónico LABEX ispjam.cu

ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA A C V CONGRESO

“LA EXPERIENCIA DOCENTE”

Agosto 15 y 16 de 1996

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
Monterrey Nuevo León, México

INFORMES:

Sra Elisa Mora
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado postal 70 - 281
México 04510, D F
Teléfono 623 2170
Fax 616 2419

COMITE ORGANIZADOR

José Víctor Calderón Salinas
Departamento de Bioquímica
Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional
Teléfono 747 7000 extensión 5225
Fax 747 7083

Jesús Manuel León Cázares
Departamento de Bioenergética
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
Teléfono 622 5637 y 622 5602
Fax 616 2282

Alejandro Zentella Dehesa
Departamento de Bioenergética
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
Teléfono 622 5609
Fax 622 5611

OBJETIVOS

El Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC, tiene como objetivo principal el que los profesores de bioquímica y áreas afines, de las licenciaturas y posgrados del país, tengan un foro donde puedan compartir sus experiencias docentes en un ambiente crítico y altamente académico.

Este congreso permite crear un foro de discusión entre los especialistas, sobre los planes de estudio, cambios a los mismos y los mecanismos para llevar a buen término estas modificaciones; análisis del proceso de enseñanza-aprendizaje y las técnicas de enseñanza empleadas en las cátedras de bioquímica, comparadas con las empleadas en otras áreas; la instrumentación de nuevas prácticas de laboratorio y la manera de optimizar sus beneficios; el análisis crítico de los sistemas de evaluación; así como las perspectivas en la experiencia docente de la bioquímica y áreas relacionadas.

PARTICIPANTES

A este foro asisten profesores, instructores de laboratorio y estudiantes de bioquímica y áreas afines, de diferentes carreras de licenciatura y posgrado del país, así como investigadores de distintas áreas interesados en la enseñanza, lo cual permite la interacción de diversos profesionales que participan en el proceso de enseñanza-aprendizaje, y propicia un ambiente adecuado para lograr la actualización, la interacción multidisciplinaria y la generación de ideas e inquietudes indispensables para el avance de la práctica docente.

TEMAS

El congreso comprenderá la presentación de conferencias magistrales, con temas de actualidad y de interés general, a cargo de académicos nacionales y la presentación de trabajos libres desarrollados en forma oral y en cartel, los cuales se agruparán dentro de las siguientes áreas:

1. Proceso enseñanza-aprendizaje
2. Técnicas de enseñanza y de aprendizaje
3. Técnicas de evaluación de la enseñanza y del aprendizaje
4. Evaluación del impacto de la bioquímica en las diferentes carreras
5. Prácticas de laboratorio (innovación, fundamento y relevancia)
6. Análisis de la estructura curricular
7. Tópicos selectos de actualización para la enseñanza

REQUISITOS PARA LA PRESENTACION DE TRABAJOS

Con la finalidad de lograr una reunión de alta calidad académica y debido a que las memorias serán publicadas en un número del Boletín de Educación Bioquímica, se ha formado una comisión, integrada por académicos con amplia experiencia, cuya finalidad será la evaluación de los trabajos que se presentarán en el congreso, de manera que satisfagan los siguientes requisitos:

1. Estar relacionados con los temas del congreso
2. Ser originales y que no hayan sido presentados en congresos anteriores
3. Ser de relevancia para la comunidad asistente al congreso
4. Resúmenes redactados correctamente
5. Resúmenes que cumplan con las indicaciones que más abajo se estipulan

De acuerdo con la evaluación, los trabajos podrán ser rechazados o en su caso regresados al autor para que realice las correcciones necesarias para su admisión y publicación en las memorias del congreso. Sólo se admitirá la participación como primer autor en un solo trabajo.

Con la finalidad de obtener unas memorias realmente útiles y que brinden una idea clara de los trabajos, los resúmenes serán más amplios de lo que convencionalmente se solicita, para que se puedan desarrollar adecuadamente los siguientes apartados: Título, Autores, Introducción, Objetivos, Métodos, Resultados, Conclusiones y Perspectivas.

INDICACIONES PARA LA ELABORACION DEL RESUMEN

1) El resumen deberá de ser escrito en DOS hojas del formato indicado.

2) Las hojas del FORMATO deberán ser de color blanco y el marco de escritura tendrá las siguientes medidas: 12 cm de ancho y 17.5 cm de largo. **NO SE DEBERA DIBUJAR EL MARCO NI REBASARLO.**

3) El título será escrito con mayúsculas y debajo del mismo se anotará el nombre completo de cada autor, sin usar iniciales y **SIN EMPLEAR TITULOS O GRADOS ACADÉMICOS.** Debajo de los nombres de los autores se citará el nombre de las instituciones participantes, así como la dirección completa.

4) Se describirá en forma clara lo que corresponda a los diferentes apartados del trabajo, anteceditos por el título del apartado en mayúsculas (**INTRODUCCION, OBJETIVOS, METODOS, RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**).

5) Se deberá usar máquina eléctrica o impresora láser con letra tipo curier 12, sin borrones ni enmendaduras, ya que el resumen será reproducido directamente del original para ser incluido en las memorias.

6) El original con DOS fotocopias de buena calidad deberá ser enviado antes del 3 de Mayo de 1996. **NO SE DEBERA DOBLAR EL RESUMEN NI ENVIARLO POR FAX.**

7) Para llevar a cabo la inscripción de los asistentes al

congreso, así como de los ponentes, se deberá anexar una hoja con los siguientes datos:

- a) Nombre completo
- b) Domicilio completo
- c) Teléfono y fax
- d) Institución en que labora
- e) Compromiso docente en esa institución
- f) Indicar si es integrante de la Asociación

Los ponentes además, deberán indicar:

- g) Area a la que pertenece su trabajo
- h) Forma en la que desea hacer su presentación
- i) Firma

TIPOS DE PRESENTACION

El autor podrá sugerir el tipo de sesión en la que desea presentar su trabajo; sin embargo, el comité organizador se reserva el derecho de decidir el tipo de presentación de acuerdo al número de trabajos inscritos.

1) Oral: En esta modalidad el autor dispondrá de 10 minutos para la presentación de su trabajo y contará con 5 minutos más para preguntas y comentarios, moderados por un coordinador. El autor deberá entregar el material de su ponencia al inicio de la sesión que le corresponda.

2) En cartel: En estas sesiones el autor colocará su material en los lugares previamente asignados, por la mañana antes de su participación. El material expuesto deberá de contener los diferentes apartados del trabajo en un tamaño tal que se pueda leer y observar claramente a una distancia mínima de un metro.

En ambas formas de presentación el autor está comprometido a presentar el trabajo y a desarrollarlo de acuerdo a la organización que incluyó en el resumen.

FORMA DE PAGO

Las cuotas de inscripción, para los socios, son de \$400.00 moneda nacional e incluyen la renovación de su membresía para el año de 1996, su participación en las actividades del congreso y la suscripción al Boletín de Educación Bioquímica. Todos los primeros autores deberán inscribirse pues los resúmenes no se aceptarán si no están acompañados de la copia del pago correspondiente.

Para los no socios la cuota es de \$500.00 moneda nacional e incluye su participación en el congreso y la suscripción al Boletín.

El pago se deberá realizar por medio de un depósito en la cuenta número 1153813-9 de Bancomer a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Se deberá enviar una copia del recibo del depósito al fax 616 2419 o bien se deberá anexar al resumen. Se recomienda conservar el comprobante del depósito para posibles aclaraciones futuras.

El Consejo Directivo

CONVOCATORIA

PARA LOS CORRESPONSALES DEL BEB

Se invita a los miembros de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C, así como a los suscriptores del Boletín de Educación Bioquímica que radiquen fuera de la Ciudad de México y zona conurbada, a que propongan profesores y o investigadores interesados en coadyuvar en las actividades del Boletín como corresponsales en su región. Es deseable un corresponsal en cada una de las instituciones de educación superior de la República Mexicana, Centroamérica, Sudamérica y otras regiones de habla hispana.

Las funciones de un corresponsal del Boletín son las siguientes:

- enviar al menos una contribución al año (propia o de su comunidad), así como las noticias relevantes de su localidad o región.
- mantener el archivo de los suscriptores del Boletín de su localidad y comunicar de inmediato los cambios en el mismo.
- colaborar en la promoción, difusión y distribución del Boletín entre los miembros de su comunidad.
- elaborar anualmente un informe de sus labores que se enviará al Comité Editorial junto con una crítica a los números del Boletín correspondientes al año.

Las propuestas para su evaluación, podrán enviarse directamente al Comité Editorial del Boletín, con atención a Sergio Sánchez Esquivel, coordinador de corresponsales, al Apartado Postal 70 - 281, México 04510, D F.

En su caso, el Comité Editorial hará la invitación formal correspondiente y el interesado podrá iniciar sus actividades como corresponsal, una vez que haya comunicado por escrito su aceptación a la misma.

El Comité Editorial

LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA, A C

CONVOCA

a la comunidad científica interesada en pertenecer a nuestra Sociedad como socios numerarios o socios estudiantes.

REQUISITOS:

SOCIOS NUMERARIOS:

- Ser investigadores que estén desarrollando trabajos en cualesquiera de las diferentes ramas de la química biológica.
- Haber publicado cuando menos dos artículos originales de investigación bioquímica.
- Ser propuestos, en cualquier tiempo, por dos miembros numerarios de la Sociedad.

d) Curriculum vitae, resaltando sus aportaciones al campo de la investigación (publicaciones) (ENVIAR COPIA FOTOSTATICA DE LA PRIMERA HOJA DE SUS PUBLICACIONES).

e) Carta-solicitud expresando las razones que motivan su propuesta, certificando asimismo, que el candidato se ha enterado de los Estatutos de la Sociedad y se comprometa a observarlos.

SOCIOS ESTUDIANTES:

- Deberán ser alumnos de alguna institución de enseñanza y o investigación que se encuentren trabajando en aspectos de investigación bioquímica.
- Presentar una carta-solicitud de admisión avalada por dos de sus profesores, miembros numerarios de la Sociedad.

DIRIGIR SOLICITUDES A:

Dr Federico Sánchez o Dr Georges Dreyfus
 Presidente Vicepresidente
 Sociedad Mexicana de Bioquímica, AC
 Edificio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM
 Apartado Postal 70 - 600,
 México 04510, D F.

Fecha límite de recepción de solicitudes: 30 de abril de 1996.

XXIII 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 XXIII Taller de Actualización Bioquímica que se realizará del 12 al 14 de agosto de 1996, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Monterrey, Nuevo León. Este taller junto con el Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C, que se realizarán en forma seriada, constituyen la "4a. SEMANA DE EDUCACION BIOQUIMICA"

Para mayores informes, dirigirse a los miembros del Comité Organizador en la Ciudad de México: Dres Federico Martínez Montes, Sara Morales López o Marco Antonio Juárez Oropeza, al Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Fax 616-24-19 o al Apartado Postal 70-159, CP 04510, México, D F y Monterrey con el Dr Juan A Rodríguez Arzave, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, al Fax (83)76-28-13 o al Apartado Postal 2790 y 119 s/n.

El Comité Organizador

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 que se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I- ARTICULOS DE REVISION

- 1) El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en el procesador de textos "Word 5", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Este deberá ir acompañado de 3 impresiones del artículo.
- 2) Se deberá incluir un resumen en idioma Español y uno en Inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.
- 3) Se aceptará un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas entre paréntesis 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 oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, 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:

Fraga C G y Oteiza P I (1995) Vitaminas antioxidantes: Bioquímica, Nutrición y participación en la prevención de ciertas patologías, Bol Educ Bioq (México) 14(1):12-17.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: The molecular biology of immunosuppression. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, pp 81-104.

Los libros se citarán de acuerdo con este ejemplo y podrán incluir las páginas totales o las consultadas:

Lehninger AL, Nelson DL y Cox MM (1993) Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 4) Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, figuras más tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o bien impresas en laser 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. Las tablas se deberán presentar conforme a alguna de las publicadas en los números de 1995.

- 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.
- 6) Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

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 según el inciso I - 3. En caso de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla, de acuerdo con las características que se indican en el inciso I - 4.

Los manuscritos serán leídos por 3 revisores. Las correcciones y sugerencias, así como las pruebas de página se enviarán al primer autor. En caso necesario se recurrirá a revisores externos al Comité Editorial.

El disco y las 3 copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70 - 281, México 04510, D F o bien a través del corresponsal del BEB en su localidad.

CONTENIDO

EDITORIAL

HACIA EL QUINTO CONGRESO DE LA ASOCIACION
El Consejo Directivo 3

ARTICULOS

EL CICLO CELULAR Y SU REGULACION: LA INTERACCION ENTRE LAS PROTEINAS CINASAS CDKs Y LA FAMILIA DE LAS CICLINAS
Alejandro Zentella Dehesa, Rebeca López Marure, Erika Gómez González, Rafael E Paredes García y María de Jesús Ibarra Sánchez 4

ASPECTOS MOLECULARES Y CLINICO-PATOLOGICOS DE LA FUNCION CHAPERONINA
Antonio Liras Martin 13

BACTERIAS LACTICAS COMO SISTEMA PARA LA PRODUCCION DE PROTEINA HETEROLOGA
Romina Rodríguez Sanoja 18

D-AMINOACIDOS EN PEPTIDOS DE SINTESIS RIBOSOMAL
Alberto Huberman Wajzman 26

OTRAS COMUNICACIONES

LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA COMO UNA HERRAMIENTA MAS EN EL LABORATORIO
Margarita M Rosas Flores 31

EL PLOMO: ¿UNA SUBSTANCIA UTIL O UN VENENO?
Martha Angélica Quintanar Escorza 36

EL CICLO CELULAR Y LA DUPLICACION DEL MATERIAL GENETICO: LA EVOLUCION DE UN CONCEPTO
Alejandro Zentella Dehesa 38

MARIETTA TUENA SANGRI: INVESTIGADORA EMERITA DEL INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR
Jesús Manuel León Cázares y María Teresa Elizabeth Flores Rodríguez 40

CONTRIBUCIONES DEL DR JOSE LAGUNA A LA MEDICINA EN MEXICO
Enrique Piña Garza y J Héctor Gutiérrez Avila 42

JONAS EDWARD SALK (1914 A 1995)
Jesús Manuel León Cázares y María Teresa Elizabeth Flores Rodríguez 44

A LOS LECTORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA. DONATIVO ANUAL 1996
El Comité Editorial 46

DONACIONES E INTERCAMBIOS

EL RECIBO DE LA COLECCION DEL PLANT PHYSIOLOGY 46

CONVOCATORIAS

II SIMPOSIUM DE ALCOHOLISMO EN EL CARIBE 46

V CONGRESO DE LA ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUIMICA, A C 47

PARA LOS CORRESPONSALES DEL BEB 49

NUEVOS INTEGRANTES DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA, A C 49

XXIII TALLER DE ACTUALIZACION BIOQUIMICA 49

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA 50