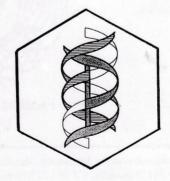
BEB 99

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C

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

COMITÉ 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

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

Facultad de Ciencias Naturales Universidad Autónoma de Ouerétaro

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

Facultad de Ouímica 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

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Instituto Politécnico Nacional

Facultad de Medicina. **UNAM**

Departamento de Bioquímica,



Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES ASOCIADOS

EDMUNDO CHÁVEZ COSÍO

Instituto Nacional de Cardiología "Dr Ignacio Chávez"

MARÍA TERESA ELIZABETH FLORES RODRÍGUEZ

Facultad de Ciencias Naturales Universidad Autónoma de Querétaro

MARINA GAVILANES RUIZ

Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México

JAIME MAS OLIVA

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

ASISTENTE EDITORIAL

ELISA SALLES MORA

Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

MARÍA DE LOS ANGELES BOFFILL CÁRDENAS

Unidad de Toxicología Experimental y Facultad de Ciencias Médicas Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba

ARMANDO FRANCISCO VARGAS ALBORES

Biotecnología Marina Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo de Sonora



Facultad de Medicina. UNAM

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (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 PERIÓDICA (Indice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,300 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP-PROV-DF-119-95; UNAM-Depto de Bioquímica y Facultad de Medicina.

EDITORIAL

INTEGRACIÓN DE NUEVOS MIEMBROS AL CONSEJO EDITORIAL DEL BEB

En el editorial anterior (BEB 17(4):147 1998), el Dr Carlos Larralde, Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, reflexionaba sobre la manera en que los investigadores pueden tener un impacto directo sobre la enseñanza de la bioquímica a nivel de las licenciaturas, cuestionamiento que había planteado previamente el Dr Barnés de Castro, Rector de la UNAM. Dar clase frente a un grupo de los primeros semestres de las carreras de medicina, veterinaria, odontología, química o biología, es sin duda, una manera de impactar en la enseñanza a nivel licenciatura. Sin embargo, existen otras maneras de apoyar y promover la enseñanza de la bioquímica. Una de estas posibilidades consiste en escribir revisiones sencillas, claras y actualizadas sobre temas clásicos o de actualidad, o hacer explícito porque un hallazgo experimental puede tener impacto en las ciencias de la salud o en la biotecnología. Alternativamente, es posible promover que otros investigadores o alumnos de nuestros posgrados escriban este tipo de trabajos que sirven como material didáctico y cerciorarse que los contenidos y los conceptos presentados en estos trabajos sean adecuados para su uso en las licenciaturas.

Esta manera de apoyar a la docencia de la bioquímica, es justamente la función del Comité Editorial del BEB que apoya a su Editor en Jefe en la conformación de cada número. Además de promover el envío de trabajos a la revista, revisa los manuscritos y emite evaluaciones editoriales; los miembros del Comité también tienen el compromiso de contribuir con revisiones, notas y otras comunicaciones. Esta labor ha fructificado en una revista con un contenido que cada vez logra tener un mayor impacto en la enseñanza de

la bioquímica, convirtiéndose en una herramienta de trabajo para profesores y estudiantes de licenciatura.

Durante los últimos 4 años el Comité Editorial ha sido dirigido por dos Editores en Jefe: el Dr Jesús Manuel León Cázares y el Dr José Víctor Calderón Salinas. Los otros siete miembros del Comité a lo largo de estos años han sido los Doctores Yolanda Saldaña Balmori, Edmundo Chávez Cosío, Alberto Huberman Wajsman, Sergio Sánchez Esquivel, Fernando Montiel Aguirre y Alejandro Zentella Dehesa.

Después de varios años de intenso y valioso servicio, algunos miembros del Comité dejan sus puestos y otros más lo harán en el transcurso de los próximos años, por lo que una nueva generación de colaboradores ha sido invitada a participar en el Comité Editorial del BEB. A partir de este número los Doctores Huberman, Chávez y Mas dejan de ser miembros de este Comité, por lo que es justo dar reconocimiento a la desinteresada labor y dedicación con la que apoyaron al BEB. Afortunadamente los Doctores Chávez y Mas, pasan a formar parte del grupo de Editores Asociados que permiten extender el rango temático de revisiones de los trabajos recibidos, asegurando un altísimo nivel en la revisión de los mismos. Ellos se suman a los esfuerzos realizados este año por la Dra Marina Gavilanes Ruiz

Al mismo tiempo queremos dar la bienvenida a un nuevo grupo de colaboradores del Comité Editorial: los Doctores Rafael Moreno del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, Federico Martínez Montes y Marco Antonio Juárez Oropeza del

Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, Emilio Rojas del Castillo del Departamento de Genética y Toxicología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, Socorro Durán Vargas del Departamento de Biotecnología del mismo Instituto y Joel Reyes de la UAM-Xochimilco.

Queremos destacar que todos ellos además de tener un importante curriculum en investigación y docencia, poseen un interés genuino por promover la enseñanza y divulgación de la bioquímica. Por otra parte, la diversidad en la adscripción de origen de cada uno de los nuevos colaboradores refleja nuestro interés por mantener una visión plural de la bioquímica y de su enseñanza. Estamos seguros de que este nuevo Consejo Editorial le dará impulso y vigor al BEB para continuar apoyando a los profesores de bioquímica con material didáctico actualizado. Con esta labor se ejemplifica otra posibilidad de

cómo los investigadores pueden impactar sobre la enseñanza básica de la bioquímica en México. Este tipo de labor impacta más allá de los límites de la institución a la que se encuentran adscritos

No podemos dejar de mencionar que a partir de este número el BEB deja de contar con el apoyo editorial que por muchos años nos brindó la Sra Elisa Mora de Salles, secretaria del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. También a ella nuestro más sincero agradecimiento y reconocimiento por su incansable entusiasmo y dedicación para hacer posible esta publicación. A partir de este número contaremos con Elisa Salles Mora, a quien damos una cordial bienvenida.

Alejandro Zentella Dehesa José Víctor Calderón Salinas

LA ELONGACIÓN CELULAR COMO UN FENÓMENO ASOCIADO A LA GERMINACIÓN EN LAS SEMILLAS

Luis Sánchez Linares, Marina Gavilanes Ruiz. Departamento de Bioquímica. Conjunto "E", Facultad de Química. UNAM. Ciudad Universitaria. 04510. México DF.

RESUMEN

La capacidad de una semilla para germinar está determinada por varios factores tanto externos como internos. Cuando fisiológicamente la semilla alcanza la madurez a través de un desarrollo dirigido por hormonas, y además se tienen las condiciones ambientales adecuadas de temperatura, humedad y aereación, entonces la semilla germinará, dando origen a una joven plántula tras una serie de acontecimientos metabólicos. El inicio de la germinación ocurre por la entrada de agua a la semilla y culmina cuando la radícula del eje embrionario emerge de ella. Tal protrusión de la radícula está determinada por la elongación de sus células. Este fenómeno de elongación celular durante la germinación ha sido objeto de estudios bioquímicos y fisiológicos, y aún se investiga el mecanismo por el cual ocurre. Se ha propuesto que una de las enzimas que tiene una participación importante en este fenómeno es la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Una vez que la radícula ha emergido de la semilla, los procesos que ocurren tienen el propósito de establecer y mantener el crecimiento de la plántula.

PALABRAS CLAVE: Germinación, protrusión radicular, elongación celular, acidificación, ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

ABSTRACT

The seed capacity to germinate is determined by external and internal factors. Once the seed reaches its physiological maturity; and temperature, humidity and aeration conditions are appropriate, the seed will germinate. Germination starts when water penetrates into the seed and finishes when the embryo radicle emerges from the seed. During this period many metabolic and physiological processes ocurr. Radicle emergence depends on cell enlargement within the radicle itself. Cell enlargement during germination has been the objective of biochemical and physiological studies; however, the mechanism by which it takes place in

seeds is not known. It has been proposed that the plasma membrane H⁺-ATPase is an enzyme of active participation in this phenomenon. Once that radicle has emerged, further processes take place in order to support growth of the young seedling.

KEY WORDS: Germination, radicle emergence, cell enlargement, acidification, plasma membrane H⁺-ATPase.

INTRODUCCIÓN

Dada la importancia del cultivo de granos en la economía mundial y siendo las semillas un componente esencial en la dieta humana, no es sorprendente que la biología de las semillas sea una de las áreas de más intensa investigación en la fisiología vegetal.

Como unidad de reproducción sexual por excelencia en las plantas superiores, la semilla es la encargada de propagar y dispersar la especie, tanto en el espacio como en el tiempo. La semilla contiene un embrión que semeja una planta en miniatura y se encuentra equipada estructural y fisiológicamente para sostener el crecimiento del embrión hasta que este se establezca como un organismo autótrofo, es decir, convertido en una joven plántula. Así entonces, durante el proceso de germinación, la semilla presenta una recuperación de la actividad biológica a partir de su rehidratación. Tal actividad biológica conduce a la protrusión de la radícula, evento que marca la finalización de la germinación de la semilla (1,2).

A pesar del intenso trabajo realizado, aún no está claro cual es el mecanismo por el cual la radícula del embrión emerge de la semilla para así completar la germinación. En este artículo, se exponen algunos de los factores bioquímicos y fisiológicos que han sido relacionados con la elongación celular, fenómeno que promueve la protrusión de la radícula, y por lo cual constituye un evento determinante para lograr la germinación de la semilla.

¿QUÉ ES LA GERMINACIÓN?

Se ha definido que la germinación es una sucesión de eventos metabólicos y fisiológicos que comienza con la rehidratación de los diferentes tejidos que forman a la semilla y termina con el inicio de la elongación de la radícula, por lo que se considera como regla práctica que una semilla ha germinado cuando su radícula en elongación atraviesa la cubierta seminal (2).

Durante el curso temporal de la germinación puede observarse un patrón trifásico descrito por el incremento en peso de la semilla debido a la toma de agua (Figura 1): en cada una de estas fases, la velo-

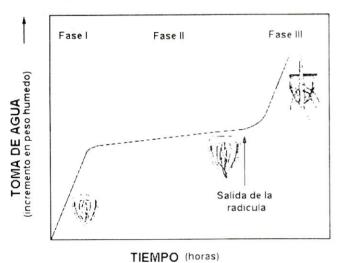


Figura 1. Perfil trifásico de la toma de agua en semillas en germinación (adaptado de Bewley y Black, 1994). Se ilustran los cambios en la morfología de la semilla de maíz.

cidad y magnitud de la captación de agua es característica, así como los fenómenos moleculares asociados a cada una de ellas. El análisis temporal de estos procesos permite visualizar prácticamente una descripción de la fisiología de la germinación (Figura 1). La fase I de hidratación está caracterizada por un incremento en la toma de agua debido a su absorción por los diferentes componentes hidrofílicos de la semilla. Con ello ocurre la reactivación de las moléculas y organelos preexistentes, los cuales fueron formados durante la maduración de la semilla y posteriormente almacenados durante el periodo de desecación de la misma. Estos eventos primarios tienen un carácter reparativo y/o transitorio, cuya finalidad es establecer las condiciones óptimas para que en tiempos posteriores se logre la protrusión de la radícula y así la germinación (3).

Durante la segunda fase se reduce considerablemente la absorción de agua por la semilla. En este periodo ocurre la síntesis activa de sustratos, coenzimas, proteínas y materiales de la pared celular necesarios para el posterior alargamiento y división de las células del eje embrionario. Todo se realiza a expensas de las reservas de nutrientes que fueron almacenados en el endospermo y desde el cual son movilizados hacia el eje embrionario (3).

Es necesario señalar que durante la transición entre la segunda y tercera fase de la germinación se presenta la protrusión de la radícula, visualizándose un cambio morfológico dado por el alargamiento de las células, y el cual conduce a la elongación de la radícula durante los primeros momentos de la tercera fase (2) (Figura 2). Posteriormente, los eventos que suceden durante la tercera fase están destinados a mantener el crecimiento del embrión, como son la movilización de los nutrientes de reserva, la síntesis de DNA y la división celular (3).

FISIOLOGÍA DE LA ELONGACIÓN CELULAR

Como se definió anteriormente, la germinación culmina con la protrusión de la radícula, lo cual implica la elongación de las células radiculares del embrión. Esta capacidad de alargamiento está influenciada por la presencia de la pared celular, la cual permite el desarrollo de la presión de turgor de la célula y el cambio de su forma. Esta presión de turgor (Y_p), es la que induce la elongación, forzando a la pared celular y a la membrana plasmática a expandirse. La entrada de agua a la célula desarrolla la presión de turgor y su magnitud y rapidez es

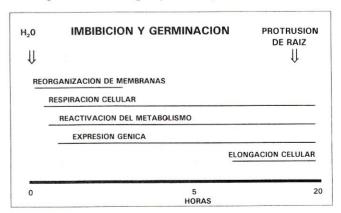


Figura 2. Expresión temporal de varios aspectos metabólicos durante la germinación. La germinación se inicia con la entrada de agua a la semilla y termina con la protrusión de la radícula.

regida por dos factores: el gradiente de potencial hídrico entre el exterior y el interior celular y la permeabilidad de la membrana hacia el agua. Por lo tanto, la velocidad de elongación de la célula también es proporcional a las magnitudes de estos factores (4).

Cuando el potencial hídrico intracelular ($Y_{cell} = Y_p + Y_p$) es más negativo que el extracelular, se favorece la captación de agua y la elongación celular. Esta disminución en Y_{cell} puede ocurrir por dos razones: i) los solutos dentro de la célula pueden aumentar, haciendo que el potencial osmótico interno (Y_p que es un valor negativo) disminuya; o bien, ii) la presión dentro de la célula (Y_p que es un valor positivo) pueda disminuir (2,4).

En el caso en que las concentraciones de solutos en las células en elongación permanezcan constantes, la fuerza impulsora para la toma de agua debe ser un descenso en la presión de turgor (Y_D). La presión dentro de la célula es causada por la resistencia mecánica de la pared celular a estirarse. Si esta resistencia se reduce por una relajación de la pared, esto conduce a una menor presión, con lo cual se reduce el potencial hídrico de la célula, de lo que resulta un mayor gradiente de dicho potencial respecto al exterior y con ello se favorece la entrada de agua. El estiramiento plástico de la pared celular (estiramiento sin regresar a sus dimensiones originales) se alcanza cuando esta se "afloja", posibilitando que las microfibrillas de celulosa se deslicen entre sí con mayor facilidad. A esto se le llama cisallamiento, el cual involucra la ruptura de los enlaces entre las microfibrillas advacentes. Sin embargo, el mecanismo exacto del aflojamiento de la pared todavía no se comprende por completo (2).

En una célula en elongación, si no se absorbieran solutos de los alrededores o se sintetizaran en el tejido, el agua que entra diluiría pronto los solutos y con ello reduciría la magnitud del potencial osmótico interno. Si sucediera así, la elongación se detendría finalmente cuando se alcanzara el umbral de la presión mínima necesaria para causar la elongación celular. Normalmente, la ausencia de una fuente de solutos produce que la pared retenga su rigidez, o bien se haga menos plástica y consecuentemente la elongación se detiene.

Por lo tanto, una célula vegetal requiere de la entrada de agua como fuerza impulsora de la elongación, pero para que exista una captación continua de agua y una elongación sostenida, se requiere de la absorción de sales minerales o de carbohidratos y de otros solutos orgánicos que se suministran por translocación o fotosíntesis, y que de esta manera mantengan el potencial osmótico celular.

BIOQUIMÍCA DE LA ELONGACIÓN CELULAR

Puesto que se ha sugerido que no hay cambios en el potencial osmótico celular durante la germinación en etapas anteriores a la protrusión de la radícula (5), es decir, la concentración celular de solutos es constante en este periodo, es en el mecanismo por el cual la pared celular pierde rigidez que se ha desarrollado un vasto campo de investigación en la fisiología vegetal.

Los estudios realizados sobre la elongación celular en tejidos que se desarrollan posteriormente a que la semilla ha germinado (coleptilos principalmente), han sugerido que uno de los factores que promueven la relajación de la pared celular es la secreción de hidrogeniones o protones (H+) hacia el espacio extracelular comprendido entre la membrana plasmática y la pared celular (apoplasto). Esta acidificación promueve la ruptura de las uniones entre los carbohidratos de la pared celular y/o estimula actividades enzimáticas en la pared celular, aunque el mecanismo preciso no se conoce. A esta concepción del fenómeno se le ha llamado "Teoría del crecimiento ácido" (6), misma que fue enunciada hace cerca de 25 años. Se sabe desde hace tiempo que el ácido indolácetico (la principal auxina presente naturalmente), estimula la secreción de protones y la elongación celular. Se ha planteado que el mecanismo por el cual se produce una acidificación inducida por auxinas está mediada por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Hager y cols. (7) han demostrado que el tratamiento de coleoptilos de Zea mays con auxina aumenta la cantidad inmunodetectable de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, y que la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, inhibe tal incremento de la cantidad de ATPasa y a su vez es un inhibidor de la elongación inducida por auxina. Similares efectos ocurren al aplicar un tratamiento con cordicepina, un inhibidor transcripcional. Estos datos sugieren por una parte, que la auxina tiene un papel activador en los procesos de biosíntesis de la ATPasa, ya sea a nivel de la transcripción de su gen y/o de la traducción de la proteína; y por otra parte, que esta enzima está involucrada en el proceso de acidificación del apoplasto en respuesta a auxina.

Son varios los mecanismos que han sido propuestos relacionando a la acidificación, la relajación de la pared celular y la elongación celular. Así por ejemplo, se han reportado actividades enzimáticas hidrolíticas en la pared celular inducidas por la acidificación (8). Esta actividad de hidrólisis sería responsable del rompimiento de los enlaces covalentes entre las microfibrillas de la pared celular y por lo tanto permitiría su relajación. Un mecanismo adicional involucra la participación de proteínas llamadas expansinas, las cuales tienen la capacidad de romper los puentes de hidrógeno entre los polímeros de la pared celular y su actividad puede ser inducida por disminución del pH (9). Estas actividades enzimáticas han sido detectadas y evaluadas en tejidos desarrollados después de la germinación; no se sabe si están presentes durante la germinación de la semilla y por tanto, su posible participación en este proceso también es desconocida.

Por otro lado, también se ha propuesto la participación de otro tipo de enzimas hidrolíticas llamadas mananasas, responsables de la hidrólisis del polímero de manosas (manano) que es el componente mayoritario del tipo de las hemicelulosas presentes en las paredes celulares del tejido del endospermo que rodea al embrión y que por su rigidez lo constriñe y previene así su germinación. Así entonces la actividad de estas enzimas sobre las paredes celulares del tejido endospérmico libera al embrión de la presión impuesta por esta estructura circundante, facilitando entonces la elongación de la radícula embrionaria (10). El hecho de que la exposición de ciertos tejidos vegetales a auxina, estimule la secreción de protones y aumente la velocidad de elongación celular, sugiere que la acidificación sobre la pared celular puede promover la protrusión de la radícula en las semillas, lo cual lleva a la posibilidad de que la secreción de protones sea un preludio a la germinación (3). Aún no se conoce si el mecanismo de elongación en las células de la radícula difiere de aquel que ha sido propuesto en otros tejidos.

LA ATPASA DE H⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DURANTE LA GERMINACIÓN

El hecho de que la acidificación de la pared celular pueda promover la protrusión de la radícula y la germinación en la semillas, lleva a considerar la participación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática durante la germinación. Esta es una enzima que lleva a cabo la translocación de protones desde el interior celular hacia el espacio apoplástico. La enzima puede realizar este transporte endergónico gracias a que lo acopla en su mecanismo catalítico a la hidrólisis de ATP, convirtiéndose así en un transductor de energía química en energía potencial conservada en el gradiente electroquímico transmembranal generado por el bombeo de protones. Esta enzima está involucrada en varios procesos de importancia fisiológica para la célula vegetal, ya que el gradiente electroquímico de protones que genera puede utilizarse en varios procesos como son: el transporte secundario de solutos, la regulación del pH celular, la apertura de estomas y el crecimiento celular (11).

Respecto a la elongación celular y la capacidad de la semilla para germinar, la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática también puede asociarse al proceso de germinación, ya que debido a que su actividad de bombeo de protones puede acidificar el espacio apoplástico, lo cual promovería la ruptura de los enlaces (covalentes y/o puentes de hidrógeno) que estabilizan la estructura de la pared celular. De esta manera se facilitaría la relajación de los polímeros de la pared celular, promoviendo la elongación de las células de la radícula (Figura 3). Por ello, la ATPasa constituiría un factor determinante para lograr la protrusión de la radícula en las semillas en germinación. Adicionalmente, el gradiente electroquímico generado por el bombeo de protones por esta enzima, representaría la fuerza motriz para el transporte secundario de solutos. Con ello, la ATPasa estaría contribuyendo primero a mantener el potencial osmótico de la célula y simultáneamente al transporte de metabolitos utilizables por las células en crecimiento en las semillas ya germinadas. Experimentalmente se ha encontrado que existe un aumento tanto en la actividad de bombeo de H⁺ como en la de hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática durante el periodo de elongación celular en la germinación

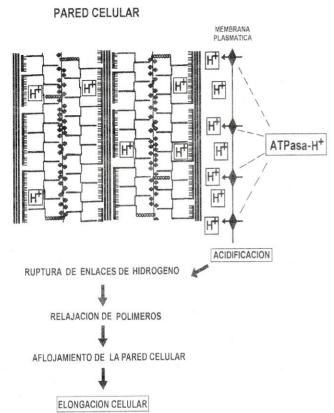


Figura 3. Representación de la relación entre la actividad de acidificación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática y la elongación celular.

de embriones de maíz (12). De acuerdo a lo que se ha expuesto, este resultado puede asociarse al requerimiento de una acidificación que promueva la elongación celular y la protrusión de la radícula.

En cuanto a la posible regulación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por auxinas durante la germinación, aún no existen reportes de la modulación de la actividad de esta enzima por esta hormona durante este particular proceso. Sin embargo, algunos trabajos sugieren la participación de auxinas: se ha determinado con semillas de Phaseolus vulgaris, Zea mays y Pinus silvestris que los niveles de ácido indolácetico aumentan claramente durante la imbibición, especialmente durante las primeras horas (13). Sin embargo, los valores absolutos de los niveles de ácido indolacético libre, en contraste con los reportados para otras hormonas, muestran amplia divergencia; se encontraron 27 ng/g. de semilla en *Phaseolus*, 182 en *Pinus* y 4505 en Zea. Tal divergencia podría sugerir que probablemente se trate de una liberación de los diferentes contenidos de esta hormona, que en su forma conjugada se encuentran en los tejidos de reserva, v que tal liberación sea el resultado de la germinación. Es posible también que diferentes especies tengan una sensibilidad diferente a las hormonas, va que por ejemplo se ha establecido que aleuronas de cebada de semillas deterioradas y con una capacidad reducida para germinar presentan una sensibilidad menor al ácido giberélico, comparadas con la de aleuronas control (14). Debe notarse que existe evidencia de que los ésteres de ácido indolacético (una de las formas conjugadas de auxinas) se encuentran al menos en las semillas de Zea mays y de Oryza sativa. En Zea mays, las formas conjugadas de ácido indolacético han sido estudiadas con algún detalle, y en ese caso, la auxina conjugada alcanza hasta los 100 mg/Kg de peso fresco (15). Sin embargo, no se ha establecido si esta liberación de auxinas tenga como objetivo promover la elongación celular que estimule la protrusión de la radícula y la germinación.

CONCLUSIONES

El proceso de germinación de una semilla abarca una serie de eventos fisiológicos y metabólicos sucesivos e interrelacionados de una manera coordinada y que culmina en la elongación de las células de la radícula para poder emerger de las estructuras que le rodean en la semilla. La regulación de estos eventos durante la elongación y protrusión de la radícula es de crucial importancia. Los estudios que se han realizado han dejado entrever varios de los aspectos que pueden estar involucrados. Sin embargo, ha sido difícil poder integrarlos en un mecanismo de acción en el que además sean considerados los efectos que puedan tener factores de respuesta al ambiente como luz, humedad, estres osmótico, temperatura, etc. (16). La capacidad de elongación de la radícula está considerada como un aspecto fundamental para lograr la germinación de las semillas. A este respecto, la "Teoría del crecimiento ácido" (1973) puede servir de base para indagar sobre el mecanismo por el cual la acidificación mediada por sistemas enzimáticos como la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, pueden promover una serie de cambios que culminan con la elongación y protrusión radicular. Los estudios sobre la regulación de la actividad de esta enzima pueden dar una visión más completa de este fenómeno de elongación celular asociado a la germinación en las semillas.

Los puntos de investigación actuales están enfocados a la obtención de semillas mutantes que son deficientes o insensibles a ácido abscísico, otra hormona la cual puede prevenir la germinación. Este tipo de mutantes adquiere importancia ya que se ha observado que el ácido abscísico tiene los efectos contrarios a los de auxina, es decir, la elongación radicular puede ser inhibida por exposición del embrión a ácido abscísico (16).

También es importante el uso de técnicas de biología molecular que permitan observar los efectos de los niveles alterados de estas hormonas en la elongación radicular y la germinación, particularmente en la posible regulación a diferentes niveles de las actividades enzimáticas que han sido involucradas en la elongación celular. De forma tal que estas aproximaciones puedan encaminarse a dilucidar el mecanismo molecular por el cual ocurre la elongación de la radícula en las semillas durante la germinación.

REFERENCIAS

- Bidwell R G S (1993) Fisiología Vegetal, AGT Editor S.A., México. p. 157,158.
- Pérez García F y Martínez Laborde J B (1994) Introducción a la Fisiología Vegetal, Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España. p. 75, 454.
- Bewley J D y Black (1994) Seeds. Physiology and Development of Germination, Plenum Press, NY, USA. p. 445.
- Devlin R M y Witham F H (1983) Plant Physiology, Wadswoth Publishing Company, Boston, USA. p. 577.
- Bradford K J (1995) Water relations in seed germination.
 En: Seed development and germination. Editores: Kigel J y Galili G. Marcel-Dekker, pp 351-396.

- 6. Cleland R E (1971) Cell wall extension, Annu Rev Plant Physiol 22: 197-222.
- Hager A, Debus G, Edel H G, Stransky H y Serrano R (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high turn-over pool of plasma-membrane H⁺-ATPase, Planta 185: 527-537.
- Inohe M y Nevis J D (1991) Auxin enhanced glucan autohydrolysis in maize coleoptiles cell wall, Plant Physiol 96: 285-298.
- 9. Cosgrove D J (1997) Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement, Plant Cell 9: 1031-1041.
- Bewley J D (1197) Breaking down the walls, a role for endo-b-mannanase in release from seed dormancy?, Trends Biochem Sci 2: 464-469.
- 11. Michelet B y Boutry M (1995) The plasma membrane H⁺-ATPase. A highly regulated enzyme with multiple physiological functions, Plant Physiol *108*: 1-6.
- 12. Sánchez Linares L, Gutiérrez Nájera N, Moreno Sánchez R y Gavilanes Ruiz M (1997) Maximal rates of acidification mediated by plasma membrane H⁺-ATPase are associated to cell elongation during maize embryo germination, Bol Educ Bioq (México) 16 (especial): 51.
- 13. Tillberg E (1977) Indolacetic acid levels in *Phaseolus*, *Zea* and *Pinus* during seed germination, Plant Physiol 60: 317-319.
- Bernal Lugo I, Rodríguez Penagos M, Gavilanes Ruiz M y Hamabata A (1999) Molecular responses of aged aleurones, J Expt Bot En prensa.
- Cohen J D y Bandursky R S (1982) Chemistry and physiology of the bound auxins, Annu Rev Plant Physiol 33: 403-430.
- 16. Bewley J D (1997) Seed germination and dormancy, Plant Cell 9: 1055-1066.

TRANSPLANTE NUCLEAR Y CLONACIÓN DE ORGANISMOS SUPERIORES

Raquel Ortega¹ y Fernando Montiel^{1, 2}. Departamentos de Biología¹ y de Bioquímica^{1, 2}, Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. 04510. México DF.

RESUMEN

A pesar de que la clonación de organismos bacterianos se lleva a cabo desde el siglo pasado y de que la clonación de plantas y animales se inició en las décadas de 1950 y 1960, respectivamente, el tema se ha vuelto de suma actualidad para el público en general a raíz del nacimiento de Dolly, la oveja clonada.

La clonación de organismos superiores tales como borregos, ganado vacuno y ratones a partir de células somáticas diferenciadas ha demostrado que, en al menos algunos tipos de células adultas, el núcleo conserva la totipotencialidad característica de la célula huevo. Al mismo tiempo, ha abierto nuevas expectativas de tipo científico y biotecnológico e, inevitablemente, ha generado una profunda inquietud por sus posibles implicaciones éticas, morales y legislativas.

PALABRAS CLAVES: clonación, transplante nuclear, código de Nuremberg.

ABSTRACT

Although cloning of bacterial organisms was achieved during the past century, the appropriate techniques for successful cloning of plants and animals have been developed during the last 40 years, allowing researchers the creation of Dolly, the renowned lamb. Cloning of higher organisms such as lambs, calves, and mice has demonstrated that in at least some types of adult somatic cells the nucleus remains totipotential. Simultaneously, new scientific and biotechnological expectations have arisen along with ethical and moral concerns on how to legislate over this matter.

KEY WORDS: cloning, nuclear transplant, Nuremberg code.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 20 años la biología molecular ha sido fuente contínua de sorpresas científicas y de

noticias de naturaleza tan importante, que frecuentemente han trascendido el campo de las revistas especializadas en reportes experimentales originales hasta abarcar no sólo a órganos de divulgación científica general, sino incluso a los medios de comunicación masiva del tipo de la prensa diaria, la radio y la televisión.

Uno de los ejemplos más recientes de ello ocurrió en el mes de marzo de 1997 cuando Ian Wilmut y colaboradores anunciaron el nacimiento de Dolly, una oveja clonada a partir de células somáticas de una oveja donadora adulta (1). Esta noticia ha sido particularmente importante no sólo por su contenido relacionado con consideraciones teóricas meditadas a lo largo de muchos años y por los delicados problemas metodológicos que tuvieron que ser superados, sino también por las implicaciones éticas, morales e incluso legislativas que este tipo de manipulaciones experimentales puede generar. Dentro de esta perspectiva, ¿Qué es lo que realmente representa el trabajo reportado por el grupo de Wilmut y Campbell? Curiosamente, la opinión pública no especializada con frecuencia ha cometido el error de asumir que la clonación de Dolly representa un avance científico muy importante simple y sencillamente por ser la primera vez que esto se logra, al menos en una especie animal. Este punto de vista es, en principio, erróneo.

LOS PRIMEROS EXPERIMENTOS

El término clona (del griego klon, klonós; retoño, rama verde) se define como una población de moléculas o células, idénticas entre sí, con un ancestro común. La clonación de células bacterianas, esto es, la producción de una población de células idénticas entre sí a partir de un ancestro común, es una manipulación que se realiza desde el siglo pasado. Podría afirmarse que fue el eminente médico alemán Roberto Koch quien por vez primera derivó grandes poblaciones de microorganismos a partir de un ancestro común durante sus brillantes experimentos dirigidos

a purificar organismos específicos a partir de una mezcla compleja y heterogénea. Por supuesto, la clonación de células animales y vegetales ocurrió más tardíamente, durante la primera mitad del siglo XX.

Sin embargo, la clonación de un organismo eucarioto superior, es decir, la generación de un organismo multicelular a partir de una población ancestral de células somáticas se reportó por vez primera en 1958, cuando el grupo de F C Steward logró obtener ejemplares viables, normales y fértiles de zanahoria silvestre (Daucus carota L.) a partir de un cultivo de células en suspensión derivado del floema secundario de la raíz de este organismo (2). Éste, fue uno de los primeros reportes acerca de la aparente totipotencialidad de la célula somática diferenciada de un organismo eucarioto superior. Poco tiempo después, primero en 1960 y luego en 1962, John B. Gurdon, entonces en el Departamento de Zoología de la Universidad de Oxford, Inglaterra, realizó el anuncio espectacular de que había logrado clonar a ejemplares fértiles del sapo africano Xenopus laevis (3). Estos experimentos de clonación consistieron en realizar transplantes de núcleos obtenidos a partir de células endodérmicas de organismos comprendidos en fases de desarrollo desde blástulas hasta renacuajos activos para luego introducirlos en una célula huevo previamente enucleada. Los resultados reportados indicaron que se obtuvo una eficiencia de clonación del 20 % cuando se utilizaron núcleos de células de organismos en fases de desarrollo comprendidas entre blástula y renacuajo en etapa de corazón funcional. Dicha frecuencia disminuyó a un 4 % cuando se utilizaron núcleos de células obtenidas a partir de organismos más desarrollados: renacuajos recién nacidos o ya activos. Asimismo, el porcentaje de animales clonados que no presentaron anormalidades anatomofisiológicas observables fue del 76 % cuando los núcleos utilizados provinieron de células de organismos en fases tempranas de su desarrollo y disminuyó al 37 % cuando se utilizaron células donadoras de organismos en las fases más tardías de desarrollo (3).

Los trabajos de Gurdon fueron los primeros en demostrar la pluripotencialidad del núcleo somático de células animales e iniciaron el camino hacia la clonación de organismos más complejos que los anfibios. Pero también mostraron claramente algo que sería recurrente en trabajos posteriores: mucho del éxito de la clonación radica en utilizar núcleos somáticos de células en fase embrionaria temprana ya que, conforme avanza en su desarrollo un organismo, la probabilidad de lograr una clonación exitosa disminuye rápidamente, puesto que menos células transplantadas se llegan a desarrollar, al mismo tiempo que aumenta la frecuencia de aparición de malformaciones.

CLONACIÓN DE MAMÍFEROS

El empleo de huevos de anfibios como Xenopus resulta particularmente atractivo, entre otras cosas por el tamaño relativamente grande de la célula (unos 2 mm) y por su considerable tolerancia a las manipulaciones experimentales. Sin embargo, en el caso de organismos filogenéticamente más complejos tales como los mamíferos, la situación es radicalmente diferente. Por ello, fue particularmente significativo el anuncio de McGrath y Solter en relación a que habían logrado obtener ratones adultos fértiles después de haber realizado un transplante nuclear mediante microcirugía y fusión celular (4). En este caso, los autores eliminaron los pronúcleos masculinos y femeninos de huevos (todavía en fase unicelular) por aspiración de los mismos mediante el empleo de micropipetas de 15-20 mm de diámetro externo. Un punto crítico en este modelo experimental lo constituyó precisamente la selección de las micropipetas, ya que éstas no podían ser más delgadas puesto que entonces no darían cabida a los pronúcleos y, por otra parte, un diámetro de 15 mm es demasiado grande para perforar a una célula de mamífero y esperar a que ésta se recupere de la manipulación con una probabilidad aceptable. Por ello, McGrath y Solter no penetraron a la célula al momento de retirar a los pronúcleos sino que los aspiraron suavemente desde fuera de la misma, produciendo un daño celular mucho menor. Asimismo, al transplantar a los nuevos pronúcleos, no los inyectaron en la célula enucleada, sino que los adosaron a la membrana celular en presencia de virus Sendai inactivados para inducir la fusión de los carioplastos (pronúcleos) y de la célula. De esta manera, los carioplastos penetraron a la célula ocasionando un mínimo de daño estructural. Los resultados finales mostraron una eficiencia experimental global del 16 % al lograrse el nacimiento de 10 animales, 7 de los cuales llegaron a la etapa adulta y 5 resultaron ser fértiles (4). Nuevamente, es importante enfatizar que en este tipo de experimentos de transplante nuclear, los núcleos empleados provenían de óvulos recién fecundados que nunca rebasaron la etapa embriológica de una célula. En estas condiciones, es evidente que el núcleo transplantado no tuvo que pasar por un proceso de reprogramación genética, ya que estaba por iniciar el proceso de formación de un nuevo organismo cuando fue transplantado a otra célula en donde dicho proceso continuó adelante.

Tres años más tarde. S M Willadsen del Instituto de Fisiología Animal de Cambridge, Reino Unido, anunció la clonación de ovejas de la raza Suffolk a partir de embriones reconstituidos utilizando óvulos no fecundados obtenidos de hembras Welsh Mountain X Cheviot (5). En este trabajo el autor utilizó como material genético a núcleos obtenidos a partir de células individuales de mórulas en estadios de desarrollo de 8 y 16 células. Nuevamente, mediante una metodología análoga a la de McGrath y Solter. Willadsen colocó a la célula blastomérica en la zona pelúcida de un óvulo previamente enucleado mediante el empleo de una micropipeta con un diámetro interno de 30 mm e indujo la fusión celular mediante el empleo de virus Sendai inactivados o bien mediante la aplicación de un campo eléctrico (electrofusión). Las células fusionadas fueron entonces embebidas en agar y transferidas a oviductos de animales en fase de diestro-estro. Los resultados reportados indican que entre el 5 % y el 48 % de los embriones sometidos a diferentes manipulaciones continuaron desarrollándose sin ningún problema aparente durante las fases embrionarias tempranas y, para la serie de experimentos reportados en dicho trabajo, se logró el nacimiento de 3 animales sanos (5). Más aún, es interesante destacar que las células donadoras de núcleos (blastocitos) fueron obtenidas 5 años antes y almacenadas en congelación hasta el momento de su empleo.

Como puede apreciarse, este trabajo demostró por vez primera, ante todo, que es posible clonar especies domésticas mayores como las ovejas, con lo que surgieron nuevas implicaciones y posibilidades biotecnológicas. Pero también demostró que el núcleo de una célula blastomérica obtenida de un embrión en fase de desarrollo de 16 células (mórula), parece ser, todavía, totipotencial.

Otro avance de considerable importancia fue anunciado por Sims y First en 1994 cuando lograron la clonación, por vez primera, de organismos bovinos (6). La metodología utilizada por estos investigadores consistió, esencialmente, en utilizar como donadoras de núcleos a células de la masa celular interna (embrioblasto) del blastocisto, cultivadas in vitro. Para ello, realizaron experimentos de fecundación y cultivo de embriones in vitro que les permitieron obtener embrioblastos. Las células de dichas estructuras embrionarias fueron disgregadas mediante técnicas inmunoquirúrgicas empleando anticuerpos antibovinos de conejo y preparados de complemento de cuy. Estas manipulaciones les permitieron obtener células embrionarias aisladas (y por ende, núcleos embrionarios), pero también permitieron cultivar in vitro a este tipo de células, evitándose que al permanecer disgregadas, continuaran diferenciándose. Estas células fueron entonces utilizadas como donadoras de núcleos fusionândolas con ovocitos a los que momentos antes se les había enucleado por succión del núcleo y cuerpo polar. La fusión celular se llevó a cabo mediante el empleo de una solución de polietilenglicol o bien mediante electrofusión.

De esta manera, de un total de 659 intentos de transplante nuclear llevados a cabo se obtuvieron 460 fusiones celulares, de las cuales 109 alcanzaron la fase de blastocisto. Treinta y cuatro blastocistos fueron transferidos a vacas receptivas resultando embarazados 13 animales. Finalmente, 4 becerros normales nacieron de 4 madres diferentes (6).

La clonación de animales bovinos puso en evidencia la aparente totipotencialidad del núcleo de células embrionarias desarrolladas hasta la fase de blastocisto y que fueron cultivadas in vitro de manera indiferenciada por un lapso de tiempo que osciló entre 6 y 100 días. Durante este tiempo, algunas células llegaron a dividirse hasta 2000 veces (11 generaciones celulares). En principio, el disponer de un cultivo in vitro establecido de células totipotenciales es particularmente atractivo, ya que facilitaría considerablemente la manipulación genética de dichas células mediante diferentes técnicas con sus consecuentes implicaciones en investigación básica, agronomía y biotecnología. Es importante destacar, sin embargo, que los 4 animales que finalmente llegaron a nacer, provinieron de

núcleos de células cultivadas por un mínimo de 6 días y un máximo de 27 días. Esto es, no se logró clonar a ningún animal a partir de núcleos de células que estuvieron multiplicándose por más de 27 días.

Resultados análogos fueron presentados en 1996 por el grupo de Ian Wilmut del Instituto Roslin de Edinburgo utilizando como modelo experimental al borrego (7). Para este trabajo, los investigadores escoceses derivaron una línea celular embrionaria (TNT4 por totipotent for nuclear transfer) a partir de células del embrioblasto de blastocistos de ovejas de raza Welsh Mountain (blancos) y la cultivaron durante 6 a 13 generaciones celulares antes de utilizar a las células como donadoras de núcleos. Por otra parte, los receptores de núcleos fueron óvulos obtenidos a partir de borregos Scotish Blackface y enucleados por las técnicas convencionales de aspiración. La fusión celular entre el citoplasto (óvulo enucleado) y la célula nucleada fue mediante la técnica de electrofusión. Lo particularmente importante de este trabajo es que las células donadoras fueron sincronizadas, previo a la fusión celular, en la fase Go del ciclo celular por eliminación parcial durante 5 días de suero en el medio de cultivo. Los autores razonaron que el correcto desarrollo de los embriones obtenidos por transplante nuclear debe de ser, en buena medida, dependiente de la apropiada interacción entre el núcleo transplantado y el citoplasma receptor de manera que pueda llevarse a cabo una adecuada reprogramación de la expresión génica por la acción de factores citoplásmicos. Si esta comunicación citoplasma-núcleo se viera entorpecida, la probabilidad de que el embrión se desarrolle normalmente será muy baja. Esto es, parecería que la clave para una clonación exitosa radicaría en encontrar un método que hiciera al núcleo donador más compatible con el citoplasma del óvulo receptor, ya que varios estudios indicaban que el principal problema en lograr que la célula transplantada se desarrolle adecuadamente es la incompatibilidad entre el núcleo donador y el óvulo receptor, produciéndose entonces anormalidades cromosómicas. Al respecto, es pertinente anotar que el óvulo maduro y listo para ser fecundado de muchos mamíferos incluído el ovino, se encuentra citogenéticamente en reposo en la metafase de la segunda división meiótica (metafase II). Por lo tanto, estos citoplastos probablemente no serían compatibles con núcleos donadores que se encontraran en la fase S o G₂ del ciclo celular ya que al interaccionar entre sí, podrían producirse rondas adicionales de replicación del ADN y condensación cromosómica prematura.

Consecuentemente, al usar como donadoras de núcleos a células sincronizadas en la fase Godel ciclo celular para fusionarlas con óvulos naturalmente detenidos en la metafase II, la probabilidad de alcanzar buenos resultados parecía, a priori, muy atractiva. Los resultados finales mostraron que de un total de 244 transplantes, 34 células fusionadas alcanzaron a desarrollarse hasta la fase de móruloblástula por lo que fueron implantadas en hembras receptivas consiguiéndose el nacimiento de 5 productos vivos. De ellos, 3 murieron a diferentes edades gestacionales y 2 finalmente sobrevivieron. Todos estos animales fueron generados a partir de núcleos de células que se habían duplicado hasta 3 veces in vitro después de ser obtenidas del embrioblasto, pero no fue posible obtener animales viables partiendo de células que se multiplicaron entre 6 y 11 veces in vitro.

Como puede apreciarse, los experimentos de Campbell y colaboradores sugirieron esencialmente que si se logra una buena compatibilidad metabólica entre el núcleo y el citoplasma, la probabilidad de lograr una clonación exitosa aumenta apreciablemente. Es decir, parecería que los fracasos anteriores podrían explicarse no tanto por una pérdida de totipotencialidad del núcleo conforme su célula se diferencia y especializa, sino por esa falta inicial de compatibilidad núcleo-citoplasma que impediría que aquel se reprogramara correctamente como núcleo de célula huevo, listo para iniciar la formación de un nuevo ser. De ser esto cierto, entonces podría pensarse que al encontrar una forma eficiente de hacer compatible el núcleo de una célula diferenciada con el citoplasma de un óvulo, sería posible la clonación de organismos animales a partir de células somáticas adultas y no solamente de células de fases embrionarias muy tempranas como había ocurrido hasta ahora. Esta suposición fue aparentemente confirmada por Wilmut y colaboradores en 1997 dando origen a su célebre publicación.

CLONACIÓN A PARTIR DE CÉLULAS SOMÁTICAS ADULTAS

El histórico experimento de Wilmut y de sus colabo-

radores consistió en trabajar con 3 tipos diferentes de células donadoras de núcleos: células embrionarias obtenidas a partir de embriones (embrioblastos) de ovejas de raza Poll Dorset de 9 días de gestación; células fetales de un animal Black Welsh Mountain de 26 días de gestación y células de glándula mamaria de una oveja Finn Dorset de 6 años de edad que se encontraba en el último trimestre de embarazo. En todos los casos los óvulos receptores provinieron de animales Scottish Blackface (1). La técnica de transplante nuclear implicó, como en ocasiones anteriores (7), el cultivo de las células donadoras de núcleos en un medio nutricional muy pobre en suero (0.5 %) durante 5 días para inducir un estado de sincronización en una fase quiescente G₀. La fusión celular se llevó a cabo mediante electrofusión y los embriones reconstruidos fueron implantados en los oviductos de animales receptivos Scottish Blackface.

De un total de 834 transplantes nucleares (385 con núcleos embrionarios, 172 con núcleos fetales y 277 con núcleos de células de epitelio mamario adulto), se obtuvieron un total de 8 nacimientos de productos a término, vivos, después de un promedio de 151 días de gestación. De estos animales, 4 provinieron de núcleos derivados de células embrionarias, 3 de núcleos de células fetales y 1 de núcleo de epitelio mamario. Esta última clona, denominada 6LL3, rápidamente se convirtió en una celebridad mundial más conocida con el nombre de Dolly (bautizada así por Wilmut en honor a Dolly Parton, la exuberante intérprete de música folklórica estadounidense). La evidencia circunstancial parecía indicar que habiéndose encontrado una forma de hacer metabólicamente compatible al núcleo con el citoplasma, la reprogramación genética del primero era ahora posible sin importar que éste proviniera de células adultas diferenciadas. Luego entonces, el núcleo de mamíferos parecía ser totipotencial a pesar de su proceso de diferenciación terminal. Lo que se había iniciado con John Gurdon en la segunda mitad de la década de 1950 parecía ahora culminar con Ian Wilmut y Dolly 40 años más tarde.

El impacto causado por la clonación de Dolly se deriva esencialmente de las siguientes consideraciones. Por una parte, como ya se apuntó, el hecho pareció demostrar que el núcleo de células somáticas adultas es totipotencial. Por otra parte, abrió la posibilidad seria de que pudieran clonarse animales agronómicamente importantes pero, sobre todo, a partir de células genéticamente manipuladas en el laboratorio para lograr la producción de sustancias comercialmente deseables en animales transgénicos. La imagen de un verdadero laboratorio-fábrica viviente dejó definitivamente de pertenecer al reino de la ciencia ficción. Pero tal vez lo que más preocupación generó en el público no especializado fue la posibilidad de que esta metodología pudiera aplicarse con diversos fines a otro mamífero: el ser humano.

CLONACIÓN Y BIOTECNOLOGÍA

El anuncio de la clonación de animales genéticamente manipulados ocurrió escasos 10 meses después de la publicación acerca del nacimiento de Dolly. Nuevamente, fue el grupo de Wilmut y de Campbell quienes lograron esa hazaña científica, la cual consistió en la clonación de ovejas portadoras de la secuencia de ADN humano que codifica para el factor IX de la coagulación (8). Como se sabe, dicho factor participa en la coagulación de la sangre y su deficiencia es responsable de la hemofilia Bo enfermedad de Christmas. En este caso, se diseñó una construcción génica en la que la secuencia de ADN codificadora para el factor IX humano fue acoplada al promotor de la b-lactoglobulina de la oveja (plásmido pMIX). Esta construcción fue posteriormente introducida por transfección en fibroblastos fetales con complemento cromosómico XX (PDFF2) cultivados in vitro y obtenidos a partir de fetos Poll Dorset de 35 días de edad gestacional. Los cultivos de células transformadas genéticamente fueron mantenidos en medio con bajas concentraciones de suero bovino (0.5 %) durante los 5 días previos a la fusión con óvulos enucleados de animales Scottish Blackface, los cuales fueron implantados en hembras receptivas de la misma raza. De un total de 507 experimentos de transplante nuclear se logró el nacimiento de 13 animales de los cuales 5 sobrevivieron a los primeros días del nacimiento. El análisis del ADN mediante la técnica de southern confirmó la naturaleza transgénica de los animales (8). La prensa general rápidamente bautizó a una de estas clonas como Polly.

Resulta importante señalar que este tipo de experimentos fueron diseñados con el objetivo de obtener hembras transgénicas que cuando se reproduzcan y entren en fase de lactancia, secreten el factor IX en la leche, de donde será relativamente fácil

aislarlo y purificarlo. Por supuesto, todavía está por determinarse si estos animales transgénicos efectivamente llegan a expresar de manera correcta el gen incorporado y si su producto aparece en la leche sin modificaciones importantes, sin degradación y en cantidades atractivas desde el punto de vista comercial. Esta información podría publicarse en cualquier momento.

Con unos cuantos meses de diferencia, a Polly y sus hermanas se unió Gene, un becerro no transgénico clonado a partir de células primordiales de un feto de 30 días de edad gestacional. Este experimento fue realizado en los Estados Unidos por una compañía de Wisconsin, ABS Global, quien no publicó los detalles experimentales pero que anunció estar interesada en este tipo de manipulaciones para "incrementar la calidad, consistencia y valor nutrimental de los productos lácteos y cárnicos" (9). Poco después, otra compañía estadounidense, Advanced Cell Technology, anunció el nacimiento, inicialmente de George y Charlie y, posteriormente, de ACT3, ACT4y ACT5. Estos animales son becerros Holstein transgénicos portadores de un marcador genético que confiere resistencia a la neomicina y fueron generados mediante la transformación genética de fibroblastos fetales en cultivo con la construcción molecular pCMV/b-GEO, consistente en una fusión del gen de la b-galactosidasa con el de la resistencia a neomicina, controlada por un promotor del citomegalovirus. Los fibroblastos transformados fueron posteriormente electrofusionados a ovocitos previamente enucleados y los embriones obtenidos fueron implantados en vacas receptivas (10). Este fue el primer paso en la producción de futuros bovinos transgénicos productores de sustancias de interés farmacológico y comercial. Si se considera que una vaca lechera de este tipo podría producir alrededor de 9000 litros de leche por año, la biosíntesis de alguna sustancia que se secrete con la leche puede convertirse en algo extraordinariamente atractivo. Este tipo de información es una clara muestra de que las enormes implicaciones comerciales de este tipo de metodología comienzan ya a ser desarrolladas por grandes empresas biotecnológicas.

TOTIPOTENCIALIDAD DEL NÚCLEO DE CÉLULAS DIFERENCIADAS

Por otra parte, al tiempo en que se anunciaba con

grandes expectativas el nacimiento de las primeras clonas ovinas y bovinas transgénicas, un par de prestigiosos investigadores, Vittorio Sgaramella y Norton Zinder, empezaron a poner en duda la validez de la afirmación de que Dolly fuera la primera clona obtenida a partir del transplante de un núcleo obtenido de una célula adulta diferenciada. argumento central de Sgaramella y Zinder partía del hecho de que después de haber transcurrido más de un año desde el nacimiento de Dolly, nadie había podido volver a clonar a un animal a partir de núcleos de células obtenidas de organismos adultos a pesar de que muchos lo habían intentado. Más aún, afirmaban Sgaramella y Zinder, el hecho de que Dolly fuera en ese momento el único intento exitoso entre unos 400 (sic) experimentos de transplante de núcleos de células adultas "no es un resultado, es una anécdota" (11). A esta crítica central se agregaban otras colaterales como que porqué se utilizaron células de una glándula mamaria de una oveja embarazada y, en todo caso, porqué no se hizo un análisis genotípico detallado del feto y de su padre para excluir la posibilidad formal de que Dolly hubiera sido clonada a partir del núcleo de una célula fetal contaminante. Por lo que respecta a una posible contaminación celular, tampoco era posible excluir con los datos publicados hasta ese momento que el núcleo que dio origen a Dolly hubiera sido tomado inadvertidamente de una célula progenitora no diferenciada (stem cell) y totipotencial, presente en la ubre ovina. Además, también se criticaba la falta de un estudio del ADN mitocondrial de Dolly y de los organismos donadores de las células utilizadas para su clonación. Finalmente, un punto adicional de suma importancia era el hecho de que no se hubieran analizado las regiones teloméricas de los cromosomas de Dolfy las cuales, teóricamente, deberían ser mucho más cortas de lo que correspondería a su edad calculada con respecto a su nacimiento (puesto que el ADN que le dio origen era, supuestamente, mucho más viejo).

Mediante un estudio adicional de 10 alelos de ADN microsatélite (9 de ellos polimórficos), Wilmut y colaboradores han podido demostrar, muy recientemente, que la probabilidad de que Dolly haya sido realmente clonada a partir del núcleo de una célula adulta es muy alta. La presencia o ausencia de cada uno de esos alelos fue determinada en el ADN extraído de la sangre de Dolly y de otros animales de

la raza Finn Dorset, de células del tejido mamario original y de células cultivadas de este tejido durante 4 generaciones celulares. Los resultados indican que los alelos presentes en el ADN de Dolly son exactamente los mismos que los encontrados en el ADN del tejido de la glándula mamaria y en el ADN de las células derivadas de dicho tejido. La probabilidad de que la asociación de estos alelos hubiera ocurrido al azar en Dolly se calculó en 1.9 X 10⁻¹² a 2.7 X 10⁻¹⁰ con un intervalo de confianza del 95 % (12).

Sin embargo, la demostración más clara lograda hasta ahora de la aparente totipotencialidad del núcleo de células somáticas adultas ha sido la clonación de Cumulina, una ratoncita clonada a partir del núcleo de las células foliculares (cumulus oophorus) de la corona radiante del ovocito de un ratón hembra B6D2 (negro) y que nació el 3 de octubre de 1997 (13). El logro alcanzado por el grupo de Ryuzo Yanagimachi de la Universidad de Hawaii ha sido especialmente importante y trascendente por varias razones. En primer lugar, porque el ratón había resultado desde hacía muchos años persistentemente refractario a los múltiples intentos que se habían realizado para clonarlo, a tal grado de que varios investigadores llegaron a pensar que ésta sería una empresa imposible. En segundo lugar y muy relacionado con el punto anterior, porque siendo el ratón uno de los modelos experimentales más utilizados en el laboratorio y de los mejor caracterizados fisiológica, bioquímica y molecularmente, la posibilidad de clonarlo permitiría abrir nuevas e importantísimas líneas de investigación. Y, en tercer lugar, porque lograr la clonación a partir de núcleos de células somáticas adultas contribuiría a despejar las dudas acerca de la totipotencialidad del núcleo de células diferenciadas.

El éxito del grupo de Yanamigachi y colaboradores se basó esencialmente en las siguientes consideraciones. En primer lugar y con base a la experiencia obtenida en los experimentos de clonación anteriores, se tomó cuidadosamente en cuenta el hecho de que la compatibilidad núcleo-citoplasma parece ser crítica en este tipo de manipulaciones. Por ello, los autores trabajaron con 3 tipos de células somáticas, diferenciadas, que se encuentran en la fase G_0 , G_0 / G_1 : células neurales, células de Sertoli y células foliculares de la corona radiante. Por otra parte, el

núcleo de los ovocitos fue aspirado con una pipeta que atravesó suavemente la zona pelúcida mediante "piezo-pulsos" y que produjo menos daño a la célula que los métodos previamente utilizados. Los núcleos de las células donadoras fueron aspirados con micropipetas de unas 7 mm de diámetro interno e invectados a los ovocitos enucleados utilizando las mismas pipetas. Un punto crítico y novedoso en todas estas manipulaciones fue el hecho de que los ovocitos transplantados no fueron inmediatamente activados tal como había ocurrido en muchos de los experimentos anteriores, sino que dicha activación se realizó (mediante la aplicación de una solución 10 mM de estroncio) entre 1 y 6 horas después del transplante nuclear. Los autores razonaron que de esta manera, el material nuclear tendría mayor oportunidad de interaccionar con los factores citoplásmicos y, por lo tanto, de reprogramarse adecuadamente. Simultáneamente, se aplicó citocalasina B para evitar la expulsión de cromosomas a los cúerpos polares (evento que, bajo circunstancias naturales, habría ocurrido pero que, al bloquearse, evita la formación de posibles productos aneuploides no viables).

En la serie de experimentos que eventualmente dieron origen a Cumulina, se hicieron un total de 1407 transplantes nucleares; de ellos, 800 embriones fueron implantados en hembras receptivas, naciendo un total de 17 animales de los cuales sobrevivieron 10. Cumulina fue el primer animal sobreviviente en nacer. Nuevamente, es pertinente señalar que todos estos animales fueron clonados a partir de núcleos de células foliculares y de que ningún transplante realizado a partir de núcleos de células neurales o de Sertoli progresó más allá de la fase de mórula-blastocisto. Como apuntan los mismos autores, esto indica que no basta que una célula esté en fase G, para que el intento de clonación resulte exitoso. Adicionalmente, Yanagimachi y sus colaboradores han demostrado que, además de ser fértiles y de tener descendencia normal, Cumulina y sus hermanas pueden donar células de la corona radiante de las que se han clonado 7 animales actualmente vivos y normales. Son las primeras clonas de clonas y demuestran que la manipulación en sí no afecta en modo alguno al proceso de clonación. En resumen, sí es un hecho real la clonación de mamíferos a partir de núcleos de por lo menos algunos tipos de células somáticas adultas.

TABLA I

EVENTOS PARADIGMÁTICOS EN LA CLONACIÓN DE ORGANISMOS

- 1876 Roberto Koch realiza los primeros experimentos de clonación celular utilizando diferentes tipos de bacterias.
- 1952 FC Steward y su grupo reportan la clonación de un organismo vegetal: la zanahoria.
- 1962 JB Gurdon logra la clonación del primer organismo animal: el sapo africano (X. laevis).
- 1983 D Solter logra clonar por vez primera a ratones a partir de núcleos de células embrionarias.
- 1986 SM Willadsen reporta la clonación de ovejas a partir de embriones reconstituidos.
- 1994 M Sims y NL First clonan por vez primera a organismos bovinos a partir del núcleo de células del embrioblasto.
- 1997 I Wilmut y su grupo clonan a Dolly, una oveja FinnDorset, a partir del núcleo de células somáticas adultas.
- 1997 I Wilmut y sus colaboradores clonan a Polly, la primera oveja transgénica.
- 1997 Advanced Cell Technology, una compañía biotecnológica estadounidense, clona a los primeros becerros transgénicos.
- 1997 R Yanagimachi y sus colaboradores clonan a Cumulina, el primer ratón clonado a partir de núcleos de células somáticas adultas.

CLONACIÓN DE PRIMATES

Con base a la información presentada hasta ahora, ¿Cuál podría ser una respuesta razonable a la pregunta sobre la posibilidad de clonación de un ser humano? Desde el punto de vista técnico, los problemas continúan siendo formidables. Pero, ignorando momentáneamente los aspectos éticos y morales, la hipotética clonación de un ser humano probablemente se centraría, por varias razones, en torno al empleo de células somáticas no embrionarias y preferencialmente adultas como donadoras de núcleos. Ello requeriría, ante todo, que el núcleo somático no embrionario sea, efectivamente, totipotencial. Asumiendo que realmente lo fuera, uno de los problemas inmediatos a resolver sería el de la compatibilidad núcleo (somático) citoplasma (óvulo). Como ya se mencionó, en los mamíferos en general los ovocitos maduros se encuentran detenidos en la metafase II (diploide), en espera de que ocurra la fecundación, de manera de que, si se utilizan como receptores de núcleos provenientes de células que se encontraban en fase S o G, del ciclo celular, posiblemente ocurrirá una incompatibilidad núcleo-citoplasma. Consecuentemente, un hipotético experimento de clonación humana también debería partir de células donadoras que de manera natural se encuentren en fase G_0 o G_0/G_1 . Adicionalmente, la estrategia diseñada por Yanagimachi para traumatizar lo menos posible a la célula receptora pero, sobretodo, el tiempo de activación de la célula después de realizado el transplante, también deberá de ser considerada.

A pesar de todos estos posibles problemas metodológicos y de que desconocemos la potencialidad del núcleo de células somáticas humanas adultas, resulta sumamente significativo el reporte de Thomson y colaboradores con relación al establecimiento de una línea celular de células progenitoras embrionarias de primate (14). En este caso, se trata de una línea celular iniciada a partir de células de blastocisto de mono rhesus que se ha mantenido en cultivo por más de un año, permaneciendo las células indiferenciadas de acuerdo a criterios morfológicos pero sobretodo bioquímicos y conservando un cariotipo XY sin ninguna alteración aparente. Este ha sido el primer reporte acerca del establecimiento de una línea de células madres embrionarias de primate y ciertamente nos acerca a la posibilidad de llegar a clonar, a partir de células embrionarias, a un primate bastante cercano a nosotros.

Como puede verse, desde el punto de vista técnico la posibilidad real de clonar a un ser humano a partir de células somáticas adultas no parece ser factible en un futuro próximo aún cuando personas como el físico de Chicago, Richard Seed, quien trabaja de manera personal, estén dispuestas a intentarlo. Pero, independientemente de ello, ¿Porqué inquieta tanto a la sociedad esta posibilidad? La pregunta tiene múltiples respuestas y varias de ellas son inherentemente obvias. La posibilidad de que individuos francamente negativos desde el punto de vista social (dictadores, líderes corruptos, empresarios inmorales, etc.) pudieran llegar a perpetuarse o incluso a multiplicarse es algo que a nadie halaga. Este temor es, sin embargo, relativamente infundado ya que no toma en cuenta que todo ser vivo, el hombre incluido, es el resultado de la interacción de 2 fuerzas: la genética y el medio ambiente (nurtura y natura). Es claro que por más que nos esforcemos, jamás podremos reproducir el medio ambiente preciso en el que un individuo creció y se desarrolló hasta alcanzar la edad adulta. En ese sentido, cada ser humano es un experimento único e irrepetible de la naturaleza.

Otra fuente de preocupación e incluso de franco temor es la de que este tipo de manipulaciones llegue a lesionar profundamente la dignidad del ser humano como otro tipo de experimentos científicos o seudocientíficos lo han hecho en el pasado. Si bien el propio ser humano ha sido voluntaria o involuntariamente un modelo experimental en múltiples ocasiones en el pasado, con frecuencia esto ha sidollevado a excesos inadmisibles. En este sentido y aún teniendo muy presente la verdad de que la historia la escriben los vencedores, es imposible negar la existencia de las atrocidades que en nombre de la ciencia se cometieron en muchos de los campos de concentración alemanes durante la II Guerra Mundial. Es posiblemente a raíz de estos acontecimientos relativamente recientes que al hombre actual no le parece una fantasía lo que el hombre es capaz de llegar a hacer consigo mismo si las circunstancias lo permiten. Precisamente por esos crímenes experimentales el 9 de diciembre de 1946 se inició en Nuremberg el Juicio de los Médicos en el que 23 médicos que realizaron experimentos en prisioneros de guerra fueron juzgados. De ellos, 16 fueron declarados culpables condenándos eles a muerte a 7; 5 recibieron la pena de cadena perpetua, 2 fueron condenados a 25 años de prisión, 1 a 15 años y otro a 10 años (15). Pero lo más importante de este juicio fue, sin lugar a dudas, el surgimiento del Código de Nuremberg, el cual, aún sin tener vigencia legal per se en ningún país del mundo, ha sido el punto de partida para establecer legislaciones que regulen la investigación en seres humanos. El Código consta de 10 principios centrados todos ellos en torno al ser humano y el primero de ellos indica textualmente que "el consentimiento voluntario del individuo (para convertirse en sujeto de experimentación) es absolutamente esencial". Asimismo, el principio 9 especifica que "el individuo tendrá la libertad de terminar el experimento si considera que ha alcanzado un estado físico o mental en donde la continuación del experimento le resulte imposible". En pocas palabras, el Código de Nuremberg sistematiza en 10 principios explícitos la máxima hipocrática de primum non nocere, es decir, el respeto a la vida, a la integridad y a la dignidad de los seres humanos (15).

Bajo esta perspectiva, ¿Quién está capacitado para tomar decisiones éticamente válidas sobre si clonar o no a un ser humano? ¿Qué principios y condiciones podrían justificar este tipo de manipulación experimental? ¿Qué explicaciones y justificaciones podrían brindársele a una hipotética clona humana adulta sobre su propia existencia? O, dicho de otra manera, ¿Cómo justificaría el hombre a sí mismo este tipo de experimentos? Aunque por ahora este tipo de preguntas puedan parecer excepcionalmente complejas, también es posible que el día de mañana pudieran tener respuestas claras y precisas al igual que muchos otros problemas que finalmente hemos superado exitosamente.

REFERENCIAS

- Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, Kind A J y Campbell K H S (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385: 810-813.
- 2. Steward F C, Mapes M O, Kent A E y Holsten R D (1964) Growth and development of cultured plant cells. Science 143: 20-27.
- Gurdon J B (1962) Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. Develop Biol 4: 256-273.
- 4. McGrath J y Solter D (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. Science 220: 1300-1302.
- 5. Willadsen S M (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature *320*: 63-65.
- Sims M y First N L (1994) Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. Proc Natl Acad Sci USA 90: 6143-6147.
- Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A y Wimut I (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 380: 64-66.
- 8. Schnieke A E, Kind A J, Richtie W A, Mycock K, Scott A R, Ritchie M, Wilmut I, Colman A y Campbell K H S (1997) Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science 278: 2130-2133.
- 9. Anónimo (1997) After Dolly, meet Gene, the cloned calf. Nature 388: 611.
- Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, Kane J J, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León F A y Robl J M (1998) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science 280: 1256-1258.

- 11. Sgaramella V y Zinder N D (1998) Dolly confirmation. Science 279: 635-637.
- 12. Ashworth D, Bishop M, Campbell K, Colman A, Kind A, Schnieke A, Blott S, Griffin H, Haley C, McWhir J y Wilmut I (1998) DNA microsatellite analysis of Dolly. Nature 394: 329.
- 13. Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, Johnson K R y Yanagimachi R (1998) Full-term development of mice

- from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature *394*: 369-374.
- Thomson J A, Kalishman J, Golos T D, Durning M, Harris C P, Becker R A y Hearn J P (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA 92: 7844-7848.
- 15. Shuster E (1997) Fifty years later: The significance of the Nuremberg Code. New Eng J Med 337: 1436-1440.

METALOTIONEINAS, BIOQUÍMICA Y FUNCIONES PROPUESTAS

Eduardo Miguel Brambila Colombres* y Patricia Lozano Zarain**. *Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP. **Centro de Investigaciones Microbiológicas, ICBUAP. Gral. Pedro Hinojosa No. 17, Lomas de Loreto, 72260, Puebla, Pue.

RESUMEN

Las metalotioneinas (MT) constituyen un grupo de proteínas ampliamente distribuidas en los organismos. Se caracterizan por tener un alto contenido de grupos sulfhidrilo provenientes de los aminoácidos cisteinas capaces de unir metales esenciales y no esenciales. Varios metales, así como una gran cantidad de factores fisiológicos y patológicos inducen la síntesis de las MT. En la actualidad, la función de estas proteínas no ha sido aclarada completamente, sin embargo, se ha postulado que pueden tener un papel importante en los procesos de detoxificación de metales pesados, regulación del metabolismo del zinc (Zn) v el cobre (Cu), estabilización de membranas celulares, activación de apoenzimas, captura y eliminación de radicales libres, así como en la modulación de la expresión de algunos genes.

PALABRAS CLAVE: Metalotioneinas, metaloproteínas, bioelementos, metales pesados, detoxificación, radicales libres.

ABSTRACT

Metallothioneins (MT) constitute a group of proteins broadly distributed in the organisms. They are characterized by a high content of tiols from cisteine residues able to bind a variety of essential and non-essential metals. MT synthesis is easily induced by metals, hormones, as well as physiological and pathological factors. At present, MT function has not been completely clarified, however, it has been proposed that these proteins can have an important role in the detoxification of heavy metals, regulation of zinc and copper metabolism, stabilization of cellular membranes, apoenzymes activation, scavenger of radical ions and expression regulation of some genes.

KEY WORDS: Metallothioneins, isometallothioneins, metalloproteins, bioelements, heavy metals, detoxification, radical ions.

INTRODUCCIÓN

Las metalotioneinas (MT) fueron descubiertas por Margoshes y Vallee en el año de 1957, cuando se aislaron de la corteza renal de los equinos y se identificaron como proteínas capaces de unir cadmio (Cd). En un principio, se consideró que la presencia de estas proteínas estaba relacionada con un mecanismo de detoxificación del Cd acumulado en el teido renal de estos animales.

Las MT son proteínas conjugadas con una baja masa molecular, capaces de ligar una variedad de metales. La química de coordinación exhibida por la unión de los metales a la proteína, la estructura química de las MT y la falta de similitud con otras moléculas biológicas de los organismos, hace suponer que estas metaloproteínas constituyen biomoléculas con características únicas en los sistemas biológicos.

DEFINICIÓN Y LOCALIZACIÓN

Las MT han recibido este nombre con base en su unión de metales y la abundancia de grupos sulfhidrilo provenientes de los aminoácidos cisteina. Estas proteínas se han identificado en el reino animal, así como en plantas superiores, microorganismos eucariotos y algunos procariotos. En los mamíferos, las MT se encuentran presentes en todos los tejidos, exhibiendo su mayor concentración en hígado, riñón, páncreas e intestino. A nivel celular, las MT se localizan principalmente en el citoplasma, sin embargo, algunos estudios han mostrado su presencia en el interior de los lisosomas y en el núcleo celular.

En los seres vivos, la concentración de las MT varia ampliamente, lo que depende de la influencia de varios factores como el tipo de organismo, el tejido, el edad, el estado de desarrollo, el régimen dietético, la historia de exposición a metales y seguramente la presencia de otros factores aún por identificar (1).

Las MT, aisladas de hígado humano, contienen en su molécula casi exclusivamente Zn, mientras que las MT aisladas de riñón, contienen Cd y Cu. Probablemente las diferencias en los metales que contienen reflejan la exposición de las MT a los diferentes iones metálicos, así como la expresión diferencial de algunas formas moleculares o isometalotioneinas (1,2).

CLASIFICACIÓN

La clasificación mas empleada se basa en las características estructurales de las MT e incluye tres clases:

La clase I comprende a las MT aisladas de los mamíferos, e incluye a todos aquellos polipéptidos con las siguientes características:

- Alto contenido de metales pesados (4-12 átomos/mol), unidos a las proteínas exclusivamente por enlaces "tiol" y formando dos agrupamientos o dominios metálicos.
- Alto contenido de cisteinas (típicamente del 23 al 33%), con una localización constante en la secuencia primaria de los aminoácidos de la proteína, ausencia de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos.
- Baja masa molecular, menor a 10,000 Daltones.
- Homología estructural o funcional relacionada con las MT aisladas de los mamíferos.

En general, las MT de clase I comparten las siguientes características: son péptidos con 61 a 62 aminoácidos, 20 de ellos corresponden al aminoácido cisteína, 6 a 8 lisinas, 7 a 10 serinas y una metionina acetilada en el extremo amino terminal, no se ha descrito la presencia de histidinas ni de aminoácidos aromáticos (1,3).

La clase II comprende a las MT con una secuencia de aminoácidos diferente a la presentada por las MT aisladas de mamíferos. En esta clase, la distribución de los aminoácidos cisteina no corresponden a la localización de las cisteinas en las MT de clase I. Estas MT han sido encontradas en eucariotos unicelulares como las levaduras y ciertos procariotes como las cianobacterias.

Las MT de la clase I y II se caracterizan por ser proteínas de cadena sencilla (3).

Las MT de clase III son polipéptidos formados por la repetición de 2 a 11 unidades glutamil-cisteinil. Reciben el nombre de fitoquelatinas cuando el aminoácido carboxilo terminal corresponde a la glicina, u homofitoquelatinas, cuando el aminoácido terminal corresponde a la β-alanina. Las fitoquelatinas son sintetizadas a partir del glutation mediante la enzima fitoquelatina sintetasa. Estas MT son estructuras oligoméricas formadas por 2 o más cadenas polipeptídicas de longitud variable (4).

POLIMORFISMO

La mayoría de los tejidos de mamíferos expresan dos formas moleculares o isoformas de MT clase I, las que separadas mediante cromatografía de intercambio iónico, se han denominado MTI y MTII. A pH neutro estas isoformas difieren en una sola carga negativa. En ungulados y primates, las MTI y MTII sometidas a cromatografía líquida de alta resolución se separan en varias formas moleculares adicionales, estas han sido designadas con letras minusculas: MTIa, MTIb, MTIc, MTIIa, etc. (1,2).

Cada una de las isoformas exhibe diferencias en sus afinidades de unión por cada metal y aún por un mismo metal, particularidad que puede estar relacionada con las funciones biológicas de las MT (5).

Las MT humanas presentan el polimorfismo genético más complejo; se ha descrito la existencia de al menos 12 genes que dan origen a diferentes isoformas, algunas de ellas características de algún tejido en particular (6).

Además de las isoformas I y II de las MT, recientemente se han descrito otras dos formas moleculares, las MTIII y MTIV.

La MTIII se localiza específicamente en cerebro, contiene 68 aminoácidos, 38 de los cuales son idénticos a los encontrados en las isoformas convencionales aisladas de otros tejidos. No obstante que el alineamiento de las cisteinas se encuentra perfectamente conservado, esta MT exhibe dos diferencias importantes; una inserción del aminoácido triptofano en la posición 5 y la inserción de 6 aminoácidos en la posición 55 de la estructura primaria de las MT de clase I. Se ha descrito que la MTIII posee una actividad inhibitoria del crecimien-

to celular en cerebro y debido a que su síntesis disminuye en pacientes con enfermedad de Alzheimer, se ha implicado en la etiología de este desorden neurológico (7).

La MTIV se localiza en los tejidos corneos, estratificados y escamosos de la piel, así como en la lengua, la parte superior del tracto digestivo y la vagina. AL parecer, durante la formación de estos tejidos se dispara la expresión de la MTIV, por lo que varios autores sugieren que esta isoforma puede jugar un papel importante en el proceso de diferenciación de estos tejidos (8).

UNIÓN DE METALES POR LAS METALOTIONEINAS

Las MT son proteínas capaces de ligar tanto metales esenciales (Zn y Cu), como no esenciales (Hg, Au, Pb, Cd, etc.). Cuando se saturan con sales de Zn o Cd, fijan 7 átomos del metal por molécula de proteína. Los metales se agrupan en dos dominios; el dominio denominado α (C-terminal), contiene 11 cisteinas capaces de fijar 4 átomos del metal, el dominio β (N-terminal) con 9 cisteínas, fija 3 metales. Los iones metálicos divalentes como el Zn y el Cd se coordinan tetrahédricamente con cuatro cisteínas (Figura 1) (1,2,9).

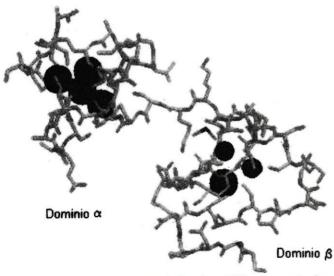


Figura 1. Estructura de las metalotioneinas. El figura muestra los dominios α y β saturados con cuatro y tres átomos metálicos divalentes respectivamente (círculos obscurós)

La unión de iones monovalentes a las MT presentan una estequiometría bastante diferente a la presentada cuando esta proteína tiene unidos iones divalentes, se ha descrito que cada molécula de MT es capaz de unir 12 metales monovalentes. Empleando técnicas de proteólisis parcial para separar los dominios de las MT, se ha encontrado que cada uno de éstos fija 6 átomos del metal monovalente. Actualmente no se conoce la estructura tridimensional de las MT con iones metálicos monovalentes, sin embargo, los complejos cisteina-metal forman enlaces de coordinación trigonales (10).

INDUCCIÓN Y SÍNTESIS

La síntesis de las MT es fácilmente inducida por una gran cantidad de factores ambientales, fisiológicos y patológicos.

En el año de 1964 Piscator describió por primera vez que los conejos expuestos a Cd mostraban incrementos en los niveles de MT hepática (3). Estudios posteriores han puesto de manifiesto que la administración de sales de Zn o Cd a animales de experimentación producen la acumulación de las MT en hígado, riñón y otros tejidos. Durnam y Palmiter en el año de 1981 demostraron que la acumulación de las MT ocurre mediante una activación transcripcional de los genes de las MT por los iones metálicos. A nivel del genoma se han descrito dos regiones de control que responden a metales y están involucrados en la inducción de la síntesis de las MT, entre estas dos regiones y para el gen de la MTIIa, existe una región de guaninas que se han relacionado con la regulación basal de estas proteínas. Además, esta región contiene las secuencias típicas tiamina-adenina-tiamina-adenina, al parecer relacionadas con el sitio de reconocimiento para la RNA polimerasa (1).

Los genes que codifican la síntesis de las MT son activados cuando las células se exponen a la presencia de metales divalentes (M²⁺) como el Cd²⁺, Zn²⁺ y Cu²⁺; esta activación requiere de secuencias de bases especificas, que se han denominado elementos regulados por metales (MREs). Las secuencias están constituidas por repeticiones de aproximadamente 17 pares de bases (1,5,11).

En el proceso de inducción de la síntesis de las MT, participa además una proteína nuclear, denominada proteína regulada por metales (MRP). Al parecer, la MRP es capaz de reconocer a los MREs y actuar como un factor de transcripción positivo

cuando se encuentra presente un M²⁺. El mecanismo mediante el cual la MRP ejerce su acción de factor regulador positivo aún no esta aclarado, se ha propuesto que los M²⁺ pueden cambiar la configuración de la proteína inicialmente inactiva (no unida al ADN), a un estado de configuración activa, capaz de unirse al ADN (11). Séguin (1991) ha mostrado que una de las secuencias de bases contenidas en el gen de las MT (MREd), se une a una proteína que requiere de un metal para adquirir una conformación adecuada que le permita unirse al ADN, al parecer, el Zn²⁺ es el único metal capaz de producir esta conformación (12).

La inducción de la síntesis de las MT en los diferentes órganos depende del metal y de los diferentes sistemas biológicos.

Además de la inducción de la síntesis de las MT por diferentes metales, una gran variedad de factores fisiológicos y experimentales han mostrado ser inductores de la síntesis de las MT. Algunos de estos factores se resumen en la tabla I.

TABLA I

FACTORES FISIOLÓGICOS Y EXPERIMENTALES QUE INDUCEN A LA SÍNTESIS DE METALOTIONEINAS (3)

Iones metálicos: Cd, Zn,	etanol
Ca, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi	
glucocorticoides	cloroformo
progesterona	tetracloruro de carbono
estrógenos	inanición
glucagón	infección
catecolaminas	inflamación
interleucina I	laparatomia
interferon	estrés físico
butirato	irradiación por rayos-x
ésteres de forbol	alta tensión de O ₂
endotoxinas	diabetes

Para algunos de los factores mencionados en la tabla I, el denominador común es un incremento de glucocorticoides. En el año de 1981, Karin y Hershman demostraron que los glucocorticoides promueven la biosíntesis de las MT en cultivos de células HeLa por un mecanismo independiente al de los metales, aunque al igual que éstos últimos, la inducción ocurre a nivel de la iniciación de la transcripción. El modelo de inducción parece iniciarse con la unión de la hormona a su receptor, el cual a su

vez, estimula la transcripción de las MT mediante una interacción directa con las secuencias de control contenidas en el ADN nuclear (1). Otras hormonas importantes en la regulación de la síntesis de *novo* de las MT son la epinefrina y la norepinefrina (3).

Recientemente han aparecido una serie de trabajos que describen la inducción de las MT por interleucinas (IL-1 e IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN) y otros mediadores de la inflamación. Aún no se ha descrito si estas citocinas favorecen la síntesis de las MT por una interacción directa con los genes de las MT, o si actúan de manera indirecta. Con ayuda de diferentes modelos de inflamación experimental, se ha puesto de manifiesto que la IL-1 y el TNF promueven la liberación de IL-6 a partir de macrófagos y células polimorfonucleares en el sitio de la inflamación, al parecer esta IL-6 induce finalmente la síntesis de las MT (13).

El IFN también se ha relacionado con la modulación de la síntesis de las MT, se ha descrito que los genes de las MT contienen secuencias de bases que reconocen a esta citocina (1).

Klassen y Lehman-McKeeman, describieron en 1989, que la síntesis de las isoformas de las MT depende del agente inductor presente en el medio celular. Su trabajo muestra que la administración de Cd a ratas, dispara la síntesis de las isoformas I y II de las MT. Al emplear Zn como agente inductor, la síntesis de cada isoforma varia respecto a la cantidad del metal administrado; "bajas" cantidades de Zn producen la inducción hepática de una mayor proporción de la MTII respecto a la isoforma I. La administración de mayores cantidades de Zn, producen una síntesis equiparable de las dos isoformas. En contraste con los metales, la administración de glucocortioides solo tiene efecto sobre la síntesis de la isometalotioneina II (14).

FUNCIONES PROPUESTAS PARA LAS METALOTIONEINAS

No obstante que el descubrimiento de las MT data desde hace 4 décadas, en la actualidad su función fisiológica aún permanece sin conocerse con exactitud. Inicialmente, y debido a su fácil inducción por diferentes metales, se propuso que estas proteínas

podían actuar como un sistema "especial" de detoxificación en los organismos expuestos a metales. Trabajos recientes sugieren que además, pueden desempeñar otras funciones de gran importancia en el metabolismo. Varios autores sostienen que las MT juegan un papel importante en la regulación del metabolismo del Zn y Cu, estabilización de las membranas celulares, captura de radicales libres y modulación de la expresión genética.

Vállee (4) ha propuesto que la molécula funcionalmente activa corresponde a la tioneina (la proteína libre de metales), al parecer los grupos sulfhidrilos de las tioneinas son los responsables de algunas funciones propuestas para las MT (4).

Metalotioneinas y metales. Dependiendo del metal presente en la molécula de las MT, éstas pueden desempeñar más de una función. Los iones metálicos Cd, Cu y Zn, observados "naturalmente" en estas proteínas, interaccionan de diferente manera con las funciones biológicas de los organismos. El Cd es altamente tóxico y no es un metal esencial. El Cu ionico, no obstante la elevada toxicidad, es requerido como un cofactor para la actividad de algunas enzimas. El Zn es un metal esencial, relativamente no tóxico, con importantes funciones de estabilización estructural en múltiples proteínas y es cofactor de una gran cantidad de enzimas relacionadas con la mayoría de los procesos metabólicos (4).

Los complejos MT-metal muestran diferentes constantes de estabilidad, lo cual depende del metal presente en las MT. La estabilidad del complejo MT-Cu es aproximadamente 100 veces mayor que la exhibida por el complejo MT-Cd, a su vez, la constante de estabilidad del complejo MT-Cd es 1 000 veces mayor que la del complejo MT-Zn (1).

Con base en lo anterior, se ha postulado que las MT pueden desempeñar al menos tres funciones distintas en los sistemas biológicos, las cuales dependen del metal contenido en las MT.

Cadmio. El Cd es un componente "natural" de los minerales de la tierra, por lo que es inevitable su absorción por los seres vivos. Se ha postulado que las MT juegan un papel fundamental como un sistema de protección celular contra la toxicidad del Cd. La elevada afinidad de las MT por el Cd y la vida

media prolongada del complejo, hacen que estas proteínas sean sumamente adecuadas para esta función. Las MT también son capaces de fijar otros metales no esenciales como: Hg, Pb, Bi, Ag, Au, Pt, etc. Al igual que con el Cd, las MT funcionarían proporcionando un sistema de protección en los tejidos de animales expuestos a metales pesados (3).

Cobre. En los sistemas biológicos el Cu es mas abundante que el Cd, además tiene funciones esenciales al actuar como cofactor de algunas enzimas involucradas en reacciones de oxido reducción. Debido a que en su forma ionica el Cu es un elemento muy tóxico, se ha propuesto que las MT pueden tener función importante al fijar el Cu ionico y así mantener baja su concentración intracelular. Algunos autores consideran que el complejo MT-Cu puede transferir el metal a las apoenzimas dependientes de Cu y permitir su activación catalítica. Existen algunas controversias respecto a este último punto. Al parecer, el complejo de las MT-Cu solo juega un papel menor respecto al metabolismo del Cu, ya que bajo condiciones "normales" su unión a las MT es demasiado fuerte como para permitir una transferencia del metal a las apoenzimas, al parecer la función de activación enzimática es ejercida por otros ligandos o proteínas aún por identificar. Bajo condiciones de alta exposición a Cu. las MT sintetizadas de novo pueden funcionar como un sistema efectivo de detoxificación, dada su elevada afinidad por los iones cobre libres.

Zinc. El Zn es un bioelemento ampliamente distribuido en los sistemas biológicos, este metal es considerablemente menos reactivo y tóxico que el cobre y el cadmio. Las enzimas dependientes de Zn catalizan un número considerablemente mayor de reacciones, que las enzimas dependientes de cobre. Las metaloenzimas dependientes de Zn están involucradas en una gran cantidad de procesos de anabolismo, catabolismo y transferencia de información genética. Se ha postulado que las MT hepáticas pueden tener un papel importante en la modulación y control de muchos de estos procesos. El mecanismo supone que las bajas constantes de afinidad entre las MT y el Zn permiten que este complejo funcione como una fuente lábil de Zn, permitiendo que el metal sea utilizado para la activación de apoenzimas en diferentes órganos. La activación enzimática puede ocurrir de manera directa con apo-enzimas inactivas, o indirecta, mediante la regulación del zinc libre en el interior celular (Figura 2).

Mecanismo 1. Activación enzimática indirecta

Mecanismo 2. Activación enzimática directa

Figura 2. Mecanismos propuestos de la transferencia de Zn a diferentes apoenzimas

Lo anterior se ha demostrado en parte, por el hecho de que los complejos MT-Zn pueden transferir al metal a diferentes apoenzimas *in vitro*, bajo condiciones de pH y fuerza ionica similares al medio celular. Las apoenzimas de aldolasa, termolisina de levadura, fosfatasa alcalina de *E. coli* y la anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino, son rectivadas en la presencia del complejo MT-Zn (9).

Metalotioneinas y radicales libres. Durante los procesos inflamatorios, la activación de neutrofilos y macrófagos por citocinas, lleva a la liberación de radicales hidroxilo (OH*) y radicales superoxido (O₂*). Durante los procesos infecciosos, los radicales libres facilitan la destrucción de células infectadas con bacterias, parásitos y virus, sin embargo, son extremadamente citotóxicos y causar daños severos en el hospedero. Para contrarestar los efectos tóxicos de los radicales libres, las células han desarrollado mecanismos especiales para su inactivacion, el sistema mas conocido lo constituye la superoxido disimutasa (SOD).

Las MT han mostrado ser sumamente eficientes en la captura e inactivación de radicales hidroxilo in vitro, no así contra los radicales superoxido. El mecanismo de inactivación no es conocido, sin embargo, se ha sugerido que los grupos tiol de las e inactivación de los radicales libres. Otros autores suponen que la captura de radicales libres por las MT permite que se libere el Zn de estas proteínas, el cual puede ser captado por las membranas celulares. Esta hipótesis esta de acuerdo con la resistencia al daño de las membranas celulares durante la peroxidación lipídica cuando está presente el Zn (5,15). No obstante que a la fecha no se tienen evidencias de una inactivación de radicales libres *in vivo* por las MT, su elevada síntesis, inducida por hormonas y citocinas, hacen suponer que estas proteínas pueden participar como un mecanismo de protección alterno en contra de los radicales libres (15).

Metalotioneinas y Modulación de la Expresión Genética. La MT son moléculas dinámicas que tienen la capacidad de intercambiar metales entre los dominios de la misma molécula, transferir metales a estructuras químicas como el glutation y las tioneinas y captar metales de otras proteínas. Como se ha descrito anteriormente, esta versatilidad química depende de las constantes de afinidad entre el metal y la tioneina, siendo sumamente útil en el control de muchos procesos bioquímicos. Varios trabajos han descrito que las tioneinas pueden desplazar al Zn de varios factores de transcripción (SP1 y TFIIIA) y donar el metal a otros. Lo anterior ha llevado a suponer que la presencia de tioneinas y las MT pueden modular algunos procesos genéticos activando o inactivando factores de transcripción por medio de la redistribución del Zn entre estas proteínas (4).

CONCLUSIONES

Las MT son biomoléculas que pueden funcionar como un sistema de detoxificación de metales pesados, captura y neutralización de radicales libres, así como un sistema de regulación homeostática para el ion Zn. Varias isoformas con diferentes afinidades por el metal Zn pueden modular el transporte de éste a diferentes compartimientos intracelulares activando apoenzimas e interactuactuando con apoproteínas, permitiendo su estabilidad estructural. Las hormonas y otros inductores tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, pueden controlar la expresión de los genes de las MT y de esta manera modular estados metabólicos celulares, cambiando la distribución y disponibilidad del zinc.

REFERENCIAS

- Hamer D H (1985) Metallothionein. Ann Rev Biochem. 55: 913-951.
- Cousins R J (1985) Absorpion, Transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. Physiol Rev. 65: 268-309.
- Kägi J H R y Schäffer A (1989) Biochemistry of metallothioneins. En: Perspectives in biochemistry I. Editor: Neurath H. Am Soc Chem. Washington D C, pp 46-52.
- 4. Vallee B L y Falchuk K H (1993) The Biochemical Bases of Zinc Physiology. Physiol. Rev. 73: 79-118.
- 5. Karin M (1985) Metallothioneins: Proteins in search of function. Cell. 41: 9-10
- Kagi J H R y Hunziker P (1989) Mammalian metallothionein. Biol Trace Elem Res. 21: 111-118.
- Kille P, Hemmings A y Lunney E A 1(994) Memories of metallothionein. Biochim et Biophys Acta. 1025: 151-161.
- Quaife C J, Findley S D, Erickson J C, Froelick G J, Kelly E J, Zambrowicks B P y Palmiter B D (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV),

- occurs during, differentiation of stratified squamous epithelia. Biochemistry 33: 7250-7259.
- Brady F O (1982) The physiological function of metallothionein. TIBS. 7: 143-145.
- Koch K A; Peña M M O y Thiele D J (1997) Cooperbinding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. Chem. and Biol. 4: 549-560.
- Séguin C y Hamer D H (1987) Regulation in vitro of metallothionein gene binding factors. Science. 235: 1383-1387.
- Séguin C (1991) A nuclear factor requires Zn+2 to bind a regulatory MRE gene encoding metallothionein-I. Gene. 97: 295-300.
- Schroeder J J y Cousins R J (1990) Interleukine 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. Proc Natl Acad Sci USA. 87: 3137-3141.
- Klassen C D y Lehman-McKeeman L D (1989) Regulation of the isoforms of metallothionein. Biol Trace Elem Res. 21: 119-129.
- Hidalgo J, Campmany L, Borras M, Garvey J S y Armario A (1988) Metallothionein response to stress in rats: role in free radical scavening. Am J Physiol. 18: E518-E524.

LIPOPOLISACÁRIDOS: EXTRAORDINARIAS MOLÉCULAS ACTIVADORAS DE SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN CELULAR

Carolina Higashida-Guerrero y Gloria Gutiérrez-Venegas. Laboratorio de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México.

RESUMEN

Los lipopolisacáridos son los componentes mayoritarios de la membrana externa de las bacterias gram negativas y entre sus funciones preponderantes sin duda alguna es su participación en el mantenimiento e integridad de estos microorganismos. Se considera que los lipopolisacáridos también denominados endotoxinas son los agentes causales del shock séptico. Su estructura consiste en tres regiones: el antígeno O, el núcleo intermedio y la región hidrofóbica interna denominada lípido A. La respuesta de las células a lipopolisacáridos es mediada a través de receptores de la superficie celular, esta asociación conduce a la activación de factores de transcripción como NFkB, expresión de genes como TNFa, pero el mecanismo el transducción intracelular comienza a ser estudiado. Este artículo consiste en una revisión de lipopolisacáridos.

PALABRAS CLAVE: lipopolisacárido, LPS, endotoxin, lípido A.

ABSTRACT

Lipopolysaccharides (LPS) are located on the outer membrane of gram negative bacteria. It is essential for maintaining the integral form an function of bacterial cell. The endotoxin (lipopolisacharide) of gram negative bacteria is believed to be reponsable of septic shock. Their structure consists of three regiones: o antigen, the intermediate core and the hidrofobic inner region called lipid A. LPS stimulation of cells is mediated through receptor interaction, gene transcription (TNF α) and transcription factor activation (NF κ B). The early intracellular events that mediate LPS response have begun to be explored. This article reviews the recent information found about lipopolysaccharides.

KEY WORDS: lipopolysaccharide, LPS, endotoxin, lipid A.

INTRODUCCIÓN

Debido a sus profundos efectos sobre las señales de transducción en las células eucarióticas, los lipopolisacáridos (LPS) han ido ganando espacio dentro del campo de la investigación en la última década.

El nombre químico "lipopolisacárido", se utiliza como sinónimo de endotoxina bacteriana. Las endotoxinas son compuestos biológicamente activos presentes en la membrana externa de bacterias gramnegativas. Inicialmente se les llamó endotoxinas debido a que se pensaba que las sustancias tóxicas estaban dentro de la célula bacteriana y que sólo podían ser liberadas por digestión o ruptura de la célula. Por más de 100 años, la endotoxina ha sido descrita como la toxina letal de bacterias gram-negativas. Sin embargo, hace unos 55 años, fue aislado el lipopolisacárido, y se encontró que era específicamente el lípido A de su estructura el responsable de la actividad endotóxica (1).

BIOQUÍMICA DE LAS ENDOTOXINAS ESTRUCTURA

La composición química básica de los lipopolisacáridos (LPS) se conoce desde hace unos 30 años. Localizado en la superficie externa de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, el LPS es una molécula anfifilica con 3 regiones: una región interna hidrofóbica, llamada lípido A; un polisacárido central que contiene heptosa y un polisacárido O-específico que actúa como antígeno serológicamente activo. La estructura de LPS mínima requerida para el crecimiento de Escherichia coli y otras bacterias gram-negativas (llamada Re LPS), consiste en el lípido A y dos unidades de la octosa 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) (figura 1). La estructura interna del LPS está formada por KDO y heptosa. Las cepas bacterianas que poseen los Re LPS mínimos son hipersensibles a

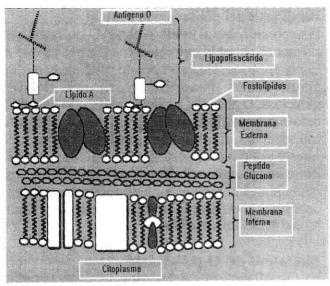


Figura 1. Representación de la envoltura celular de E. coli.

detergentes y antibióticos hidrofóbicos, lo cual sugiere un avance evolutivo hacia las formas completas de LPS.

La especificidad serológica de los LPS radica en el polisacárido O-específico, mientras que el centro bioactivo o endotoxina como tal, corresponde al lípido A, que en un extremo tiene ácidos grasos y en el otro grupos fosfato, por lo cual es anfifilico; cuando los LPS están aislados, forman micelas biológicamente activas.

BIOSINTESIS

Biosíntesis del lípido A

La mayoría de las actividades biológicas de los LPS se atribuyen a la región del lípido A, debido a que posee actividad endotóxica por sí mismo. El lípido A ancla al LPS a la membrana celular. La estructura básica del lípido A es común entre bacterias gramnegativas, incluyendo enterobacterias, neisserias, pseudomonas y otras que presentan propiedades endotóxicas (figura 2).

Recientemente se descubrieron varias enzimas en *E.coli* capaces de convertir a los precursores UDP-GlcNAc, R-3-hidroximiristoil-ACP, ATP, CMP-KDO, lauroil-ACP y miristoil-ACP a Re LPS y se han encontrado enzimas similares entre varios gramnegativos patógenos.

El primer paso en la biosíntesis de la endotoxina es la acilación de la UDP-GlcNAc con R-3-

hidroximiristato, catalizado por la proteína codificada en el gen lpxA (1). UDP-GlcNAc está situado en un punto de bifurcación en el camino metabólico, puesto que también se utiliza para la biosíntesis de peptidoglicano. R-3-hidroximiristoil-ACP, localizado en otro punto de bifurcación, puede ser elongado a palmitoil-ACP e incorporado a los glicerofosfolípidos. Se han observado al menos 2 genes para la biosíntesis de ReLPS (lpxA y lpxB), los cuales están contenidos en un operón en el cromosoma de E.coli.

UDP-3-O-(*R*-3-hidroximiristoil)-GlcNAc es desacetilado y luego es N-acilado con un segundo *R*-3-hidroximiristato, generando al nucleótido UDP-2,3-diacilglucosamina. Tanto O- como N- aciltransferasa exhiben una especificidad muy precisa por el *R*-3-hidroximiristato.

UDP-2,3-diacilglucosamina es el precursor inmediato para la unidad no reductora de lípido A, pero una parte es unida por una pirofosfatasa específica para generar una molécula muy inestable que ha sido designada como lípido X, el cual es el precursor directo del extremo reductor del lípido A. El producto del gen *lpxB* cataliza la formación de disacárido, y después una cinasa específica incorpora al 4'-monofosfato, generando al lípido IVA, un intermediario que posee algo de bioactividad, por lo cual tiene utilidad en la detección de proteínas receptoras de endotoxina en células animales.

Antes de que se complete el lípido A, la enzima codificada por el gen *kdtA* incorpora dos residuos

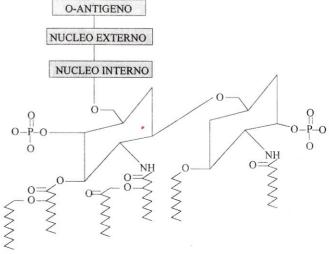


Figura 2. Estructura de los lipopolisacáridos.

de KDO estereoquímicamente distintos. Finalmente se incorpora un residuo de laureato y uno de miristato al extremo no-reductor del lípido A (figura 3).

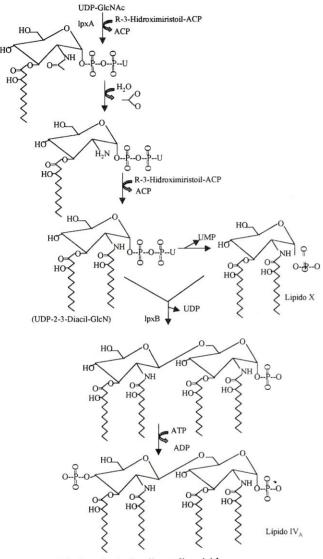


Figura 3. Biosíntesis de los lipopolisacáridos.

Se desconoce el mecanismo por medio del cual el LPS se exporta desde su sitio de biosíntesis en la superficie interna de la membrana interna hacia la superficie externa de la membrana externa.

Las variaciones menores en la estructura del lípido A modifican sus señales biológicas. La remoción de todos los ácidos grasos resulta en la pérdida completa de actividad biológica. También, la ausencia de solo uno de los grupos fosfatos, ya sea en C1 o C4, resulta en la pérdida significativa de toxicidad.

Biosíntesis del polisacárido central

Esta porción une al lípido A con el O-polisacárido. Es menos variable entre géneros y especies que el O-polisacárido. Está compuesto por 5 azúcares: un amino azúcar (N-acetilglucosamina), glucosa, galactosa, L-glicero-O-manoheptosa, y la octosa 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO). El polisacárido central se separa en área interna y área externa. El área interna contiene heptosa, fosfato y ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), el cual está unido covalentemente al lípido A por uniones cetosídicas ácido-lábiles. Las bacterias mutantes incapaces de sintetizar KDO no son viables.

Biosíntesis del O-polisacárido

El O-polisacárido determina la especificidad antigénica de las bacterias y sus LPS. Los constituyentes del polisacárido O-específico varían entre especies y aún entre cepas, pero los miembros de un serogrupo tienen al menos uno de los determinantes O-antigénicos en común con miembros de un serogrupo distinto.

El análisis bioquímico del O-polisacárido ha revelado la existencia de una secuencia de 10 a 100 o más unidades de oligosacáridos repetitivas compuestas de 3 a 4 monosacáridos. Cuando las condiciones del medio son estresantes, como temperaturas muy altas, bajo pH, bajos niveles de fosfato o magnesio o altos niveles de sales, pueden darse cadenas más cortas. Los siguientes monosacáridos han sido aislados de distintas bacterias: pentosas, 4-aminopentosa, hexosas, 2-aminohexosas, 3,6-desoxihexosas, 6-desoxiazúcares, etc. Las bacterias entéricas que producen O-antígenos con un grupo amino altamente hidrofóbico (ej: didesoxi-azúcares), tienden a ser más patógenos.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL LPS

Los efectos patológicos y biológicos de los LPS en los humanos y animales reflejan la activación de linfocitos y macrófagos. El lípido A es un biomodificador pleiotrópico potente, que causa muchos de los efectos fisiopatológicos asociados a la infección por bacterias gramnegativas. La respuesta al LPS depende de la especie, la dosis, el sitio o ruta y la velocidad de liberación a sistema circulatorio. Dosis pequeñas, no letales de LPS causan cambios drásticos en la temperatura corporal, el sistema hematológico, el sistema inmune, el sistema endócrino

y en el metabolismo. Una dosis letal puede provocar hipotensión, coagulación intravascular diseminada, choque irreversible y finalmente la muerte.

Fiebre

La fiebre ocasionada por los lipopolisacáridos se debe a la acción de estos agentes sobre el centro termorregulador en el cerebro, o más probablemente, a la acción indirecta del LPS sobre los leucocitos sanguíneos o sobre otros tejidos, que liberan un pirógeno endógeno inductor de la producción de mediadores como prostaglandinas (PGE₂), las cuales actúan directamente sobre los centros de control de temperatura en el cerebro. Otros pirógenos endógenos son interleucina-1(IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina-6(IL-6), cuya síntesis es inducida por LPS.

Fenómeno inmunológico

El O-polisacárido es un antígeno potente que en concentraciones de microgramos puede estimular la síntesis de anticuerpos en animales. De 3 a 4 días después de una inyección intravenosa de LPS, los anticuerpos circulantes contra LPS son detectables y son predominantemente IgM, IgG e Ig A. La estructura O-antigénica del LPS controla la activación del complemento por la vía alterna. Como consecuencia, las bacterias adquieren C3b de superficie que interactúan con los receptores a C3b de células fagocíticas del huésped.

RECEPTORES

La naturaleza de la interacción entre LPS y sus células blanco ha sido materia de mucha especulación. En un principio se pensó que el amplio espectro de actividades del LPS, se debía a su estructura anfipática, por lo que se sugirió que el LPS actuaba inespecíficamente vía la interacción hidrofóbica del lípido A con los lípidos de membranas celulares blanco. Sin embargo, la activación selectiva por LPS de linfocitos B en vez de linfocitos T, la existencia de varias líneas de ratones que presentaban respuestas inmunológicas y fisiológicas disminuídas a LPS, la existencia de mutantes y la identificación de antagonistas a la bioactividad de la endotoxina (2), sugirieron la presencia de un receptor o receptores de membrana específicos para el lípido A del LPS. Sin embargo, los estudios de la unión a receptores se han visto dificultados debido al estado incierto del lípido A y de las endotoxinas en agua.

Papel de CD18 en la unión de macrófagos a eritrocitos cubiertos por LPS

Los antígenos CD18, también conocidos como integrinas β -2 o integrinas leucocíticas, unen a LPS cuando se presentan en la superficie de eritrocitos cubiertos por LPS o bacterias. Sin embargo, no es probable que las moléculas CD18 jueguen un papel importante en la transducción de señales, puesto que leucocitos de pacientes con deficiencia congénita de CD18 sintetizan TNF- α en respuesta a los LPS. También se ha demostrado que en monocitos normales, los anticuerpos contra CD18 no previenen la síntesis de TNF en respuesta a LPS (3).

LBP: Proteína de unión a LPS

El descubrimiento en 1986 de una proteína plasmática llamada LBP (lipopolysaccharide binding protein), fue el evento más importante para descifrar los mecanismos de activación celular inducidos por LPS. La proteína LBP es una glucoproteína sérica de 60-kDa, presente en el suero normal a concentraciones menores a 0.5 µg/ml, y que se eleva hasta 50 µg/ml después de una respuesta de fase aguda. LBP es sintetizada en los hepatocitos como un polipéptido sencillo de 50-kDa y luego es liberada en plasma como la forma glucosilada de 60-kDa (4). Después de una invección con LPS, hay un aumento de 20 veces sobre la expresión basal de los niveles de RNAm en hepatocitos, lo que sugiere que el LPS estimula la expresión de LBP. sugiere que la síntesis de LBP por los hepatocitos es controlada por LPS, IL-1, TNF, IL-6 y glucocorticoides y que el pretratamiento con LPS predispone a los hepatocitos a responder a LPS, TNF e IL-1 para la síntesis de LBP.

La unión específica de la LBP al LPS se da a través del lípido A. La caracterización de la función de LBP como determinante de las respuestas celulares a LPS reveló un mecanismo para la activación celular inducida por LPS que involucraba un receptor de membrana para los complejos LPS-LBP.

Se han sugerido dos funciones para LBP: opsonización de partículas unidas a LPS y aumento de la sensibilidad de leucocitos a LPS. LBP funciona como opsonina al unirse a bacterias gramnegativas o a eritrocitos cubiertos por LPS (5). Después, los monocitos, macrófagos y neutrófilos pue-

den unirse con alta afinidad a la partícula resultante cubierta por LBP. El pretratamiento con LBP de eritrocitos cubiertos por LPS permite su unión a los macrófagos; pero el pretratamiento de macrófagos con LBP no tiene efecto alguno. Por otra parte, los macrófagos no reconocen a eritrocitos cubiertos con LBP a menos que también se haya añadido LPS, lo que sugiere que la interacción de LBP con LPS resulta en un cambio conformacional de LBP, que permite el reconocimiento por los macrófagos. Parece ser que la LBP participa como las opsoninas clásicas, IgG y C3, en la liquidación de bacterias, aunque aún no se ha reportado alguna demostración de esto *in vivo*.

LBP puede tener importancia en la movilización de defensas del huésped para combatir infecciones por gram-negativos. En los neutrófilos, la LBP participa en la producción del anión superóxido inducido por ésteres de forbol (6). Los complejos LBP-LPS son mil veces más activos que el LPS por sí solo en la inducción de TNF y de ILβ.

La estructura primaria de LBP fue deducida al secuenciar cDNAs clonados. El cDNA humano de LBP codifica una proteína con una secuencia de 25 residuos hidrofóbicos que preceden a la proteína madura de 452 residuos. La proteína madura tiene cuatro cisteínas y cinco sitios de glucosilación potenciales (7). Con la clonación del cDNA se confirmó la hipótesis de que LBP está relacionada a otra proteína unión a LPS presente en los netutrófilos: la BPI (bactericidal/permeability increasing protein). Aproximadamente un 44% de los residuos de aminoácidos de la LBP y la BPI humana son idénticos, y

ambas comparten identidad de secuencia con otra proteína, la proteína transportadora de ésteres de colesterol del plasma.

CD14: receptor para los complejos LPS-LBP

Al caracterizar la función de LBP como determinante de las respuestas celulares a LPS, se reveló un mecanismo de activación celular que involucraba un receptor de membrana para los complejos LPS-LBP. El segundo gran avance se hizo cuando se identifica a este receptor como CD14, una glucoproteína de 55-kDa originalmente descrita como un antígeno de diferenciación de monocitos y macrófagos Hoy se sabe que CD14 juega un papel clave en la activación celular inducida por LPS.

CD14 puede encontrarse como una proteína sérica soluble (sCD14) y también puede estar anclada a la membrana de células mieloides a través del glucosilfosfatidilinositol (GPI) (mCD14). mCD14 participa en la activación de células mieloides, mientras que sCD14 participa en la activación de células no mieloides, como células endoteliales o epiteliales, que normalmente no expresan mCD14 (8,9).

Al entrar el LPS a la circulación, la proteína LBP se le une rápidamente, y los complejos LPS-LBP resultantes son reconocidos por el receptor CD14 de células mononucleares. Éste, unido al complejo, puede activar la síntesis de TNF en estas células, ya sea de manera directa o indirecta, transportando al LPS a la superficie celular, de manera que otras proteínas son estimuladas (figura 4). En cualquiera de los 2 casos, el mecanismo de acción entre CD14

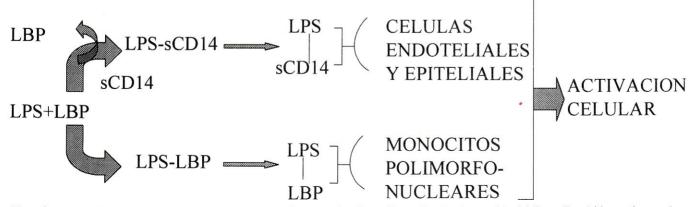


Figura 4. Interacción entre la proteína LBP y la proteína CD14 con los lipopolisacáridos. La interacción del lipopolisacárido con la proteína CD14 (LPS-CD14) promoverá la activación de células endoteliales y epiteliales. La asociación lipopolisacárido con la proteína LBP promoverá la activación de los monocitos.

y LBP difiere de los mecanismos usuales por medio de los cuales las células eucarióticas responden a otros agonistas, como hormonas o linfocinas. La unión del agonista (LPS) es mediada por una proteína soluble, en vez de una proteína unida a membrana. Unicamente después de la formación de un complejo soluble, es posible que el LPS se asocie con un receptor de membrana.

La unión de LPS-CD14 en fagocitos mononucleares promueve la síntesis de varias citocinas, como IL-1 que están involucradas en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, CD14 no tiene un dominio transmembranal y varias líneas de evidencia reciente sugieren que la función de CD14 es la de unirse y amplificar las respuestas a LPS, pero que en realidad no transduce una señal transmembranal. En el estudio de Takasuka, et al. (10), se llegó a la conclusión de que ni CD14 ni PKC están involucradas en la activación y supresión de la expresión génica de TNF-α inducida por LPS.

Se ha sugerido la existencia de otras proteínas de superficie que actúan como receptores para LPS; aunque CD14 es la única proteína de estructura bien definida que se une a LPS y es el mediador de la activación celular inducida por LPS (11), se tiene evidencia que existen caminos alternativos coexistentes. Parece ser que CD14 es el receptor a LPS que predomina en los monocitos periféricos y es el que está mayormente involucrado en las respuestas agudas de citocinas ante gramnegativos. Sin embargo, se ha visto que CD11/CD18, un miembro de la familia de integrinas leucocíticas, también funciona como un receptor de señal transmembranal para LPS. Estas glucoproteínas transmembranales se expresan en la superficie de monocitos, macrófagos y granulocitos y participan en numerosas interacciones célula-célula y célula-sustrato.

Por otra parte, algunos estudios señalan que los ácidos grasos de los lipopolisacáridos son esenciales para activar células B y macrófagos, por lo que se ha sugerido que el LPS podría activar a estas células directamente al insertarse en la membrana, en vez de unirse a un receptor de superficie.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL

El camino completo de señales inducidas por LPS que resultan en la activación de la expresión y se-

creción de citocinas aún no está completamente caracterizado.

En las líneas anteriores se han mencionado los aspectos funcionales de la interacción LPS-LPB-CD14; sin embargo, el disparo de las señales intracelulares probablemente esté mediado por la interacción con un receptor adicional. Weinstein y colaboradores (12) encontraron que el LPS induce fosforilación de tirosinas de una proteína de 74-kDa que es estrictamente dependiente de CD14. Por otro lado, anticuerpos anti-CD14 bloquearon la fosforilación de tirosinas inducida por LPS de proteínas de 41 y 42-kDa a concentraciones de LPS menores a 100 ng/ml, pero no hubo bloqueo cuando se utilizaron concentraciones mayores de LPS. Estos hallazgos sostienen la existencia de un camino dependiente de CD14 y otro camino independiente de CD14 para la secreción de citocinas inducida por LPS.

La secreción de TNF-α y de IL-1β estimulada por LPS en monocitos humanos es dependiente de la actividad de dos enzimas de transducción: la proteína cinasa C (PKC) y la proteína tirosín-cinasa (PTK) (13). La activación de la transcripción génica de las citocinas puede involucrar varios caminos de transducción. El primero de ellos es una cascada de cinasas, comenzando por la activación de PKC y seguido por la activación de PTK. Sin embargo, la fosforilación de tirosinas alcanza su máximo a los 15 minutos de la estimulación con LPS y declina a los 30 minutos, mientras que la activación de PKC alcanza su máximo solo después de 30 minutos. Además, la fosforilación de tirosinas en monocitos estimulados con LPS no puede ser mimetizada por la activación directa de PKC. Otro mecanismo posible involucra a receptores de LPS que están unidos a PTK, que a su vez activan a PKC. Esta hipótesis fue probada utilizando un ensayo de actividad de PKC, un inhibidor específico para PTK y un anticuerpo contra CD14. Los resultados mostraron que a pesar de que LPS causa actividad transitoria de PKC, ni la inhibición de PTK ni el bloqueo de CD14 alteraron la activación de PKC inducida por LPS, lo cual sugiere que es posible que el LPS active a PKC a través de un receptor que no está unido a PTK ni a CD14. Esta hipótesis está apoyada por la existencia de más de un tipo de sitio de unión a LPS en la membrana de los monocitos (14).

La herbimicina A, un inhibidor de la PTK, inhibe la secreción de TNF-α, lo cual sugiere que una PTK sensible a herbimicina A está involucrada tanto en el camino dependiente de CD14 como en el camino independiente de CD14. De hecho, se ha sugerido que tres de las PTK-s de la familia scr son activadas por los LPS, pero solo una de ellas (p53/56^{lyn}) está directamente asociada a CD14. En otro estudio se determinó que la inhibición de PKC redujo los niveles de RNAm para IL-6, pero que no afectó los niveles de IL-1β ni de TNF-α. Por otra parte, la inhibición de PTK disminuye la activación inducida por LPS del factor transcripción NFκB. Este factor de transcripción está involucrado en la transcripción de los genes de IL-6 y de TNF-α. Estos datos nos llevan a concluir que diversas PTKs están involucradas en el camino de señales celulares inducidas por LPS.

El tratamiento con LPS de un tipo celular definido causa tres cambios principales en el núcleo: 1) Hay un cambio rápido en la sensibilidad de la región de unión a la DNAsa I, lo que sugiere que se está abriendo la configuración de la cromatina del gen determinado. 2) Aumentan 2 factores nucleares: NFκB que se une al sitio EκB en la región promotora intrónica, y OTF-2, que se une a un octámero en la región promotora.

El siguiente paso en la cascada de transducción de señales inducidas por LPS es la activación de NFκB, factor de transcripción que se encuentra en citoplasma formando un complejo inactivo unido a la proteína inhibidora IκB. Una de las cinasas que fosforila directamente a IκB es la PKC. Cuando IκB es fosforilada, NFκB se disocia y se transloca al núcleo en una forma activa que se une al DNA, permitiendo la transcripción génica y la síntesis de TNF-α y de IL-1β.

Otro camino intracelular de señales activado por el LPS es el de la MAP cinasa (mitogen activated protein kinase pathway). La MAP es una proteína asociada a los microtúbulos del citoesqueleto, y a través de ella, el LPS podría afectar la fisiología celular al perturbar el sistema de cinasas y fosfatasas asociadas con el citoesqueleto, un organelo que tiene efectos profundos sobre transcripción génica, síntesis de proteínas, transporte intracelular, endocitosis, secreción y forma celular. Varios ligandos

extracelulares, como el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento nervioso, ésteres de forbol e insulina pueden estimular el camino de la MAP cinasa. Entre los miembros de este camino está una familia de proteín-cinasas de serina/treonina de 40-45-kDa, llamadas ERKs (extracellularly regulated protein kinases). Al menos tres diferentes miembros de las ERKs, ERK1, ERK2 y otra proteína de 38-kDa son activadas por la fosforilación de tirosinas en monocitos después de la estimulación con LPS (15).

El LPS es un reactante oxidante. El tratamiento de células con reactantes oxidantes como el H₂O₂ y el LPS activa al factor de transcripción NF-κB. De hecho, con el tratamiento de células con LPS se produjo H₂O₂ y 1.5 horas después, se transcribieron los protooncogenes *fos* y *jun* (13).

CONCLUSIONES

Los LPS son moléculas que han ido ganando espacio en el campo de la investigación durante los últimos años debido a sus múltiples efectos sobre la fisiología celular y su participación determinante en procesos infecciosos.

El conocimiento de sus mecanismos de acción, ha llevado a dilucidar varios caminos de activación celular, contribuyendo así a descifrar incógnitas en los mapas de señales de transducción celular. El profundizar en su estudio conducirá a la identificación de todas las proteínas y receptores transductores de señales de las células animales que al reconocer a los LPS desencadenan la síntesis de proteínas específicas, lo cual hará posible la caracterización bioquímica de la transdución de señales mediada por LPS.

REFERENCIAS

- Raetz C R H (1990) Biochemistry of endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 59:129-170.
- Takayama K, Qureshi N, Beutler B y Kirkland T N (1989) Diphosphoryll lipid A from *Rhodopseudomonas* sphaeroides ATTC 17023 blocks induction of cachectin in macrophages by lipopolysacharides. Infect Immunol, 57: 1336-1338.
- Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, Ulevithch R J y Mathison J C (1990) CD14: a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science 249: 1431-1433.

- Ramadori G, Meyer zum Buschenfelde K H, Tobias P S, Mathison J C y Ulevitch R J (1990) Biosinthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. Pathobiology 58: 89-94.
- Wright S D, Tobias P S, Ulevitch R J y Ramos R (1989) Lipopolysaccharide binding protein opsonizes LPS bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. J Exp Med 170: 1231-1241.
- Vosbeck K, Tobias P S, Mueller H, Allen R A, Arfors K E, Ulevitch R J y Sklar L A (1990) Priming of polymorphonuclear granulocytes by lipopolysaccharides and its complexes with lipopolysaccharide-binding protein and high density lipoprotein. J Leuk Biol 47: 97-104.
- Shumannm R R, Leong S R, Flaggs G W, Gray P W, Wright S D, Mathison J C, Tobias P S y Ulevitch R J (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram negative sepsis. J. Biol Chem. 263: 13479-3481.
- Goldblum, et.al. (1992) Lipopolysaccharide (LPS)binding protein and soluble CD14 function as accessory molecules for LPS-induced changes in endothelial barrier function in vitro. *J. Clin. Invest* 93: 692-702.
- Ingalls R, Golenbock D (1995) CD11c/CD18, A transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. J Exp Med 181: 1473-1479.

- Takasuka N, Matsuura K, Yamamoto S y Akagawa K S (1995) Suppression of TNF-alfa mRNA expression in LPS-primed macrophages occurs at the level of nuclear factor kB activation, but not at the level of protein kinase C or CD14 expression. J Immunol. 154: 4803-4812
- 11. Ulevitch R J y Tobias P S (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Annu Rev. Immunol, 13: 437-457.
- Weinstein S L, June C H y De Franco A L (1993) Lipopolysaccharide-induced protein tyrosine phosphorilation in human macrophages is mediated by CD14. J Immunol. 151: 3829.
- Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S y Van Dyke T E (1994) Involvemente of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-α and and IL-1-β production by human monocytes. The Journal of Immunology. 153: 1818.
- 14. Morrison D C, Lei M G, Kirikae T y Chen T Y (1993) Endotoxin receptors on mammalian cells. Immunobiology, 187:212.
- Willis S y Nisen P (1996) Differential induction of the mitogen-activated protein kinase pathway by bacterial lipopolysaccharide in cultured monocytes and astrocytes. Biochem. J 313:519-524.

BIOLOGÍA FUNCIONAL DE LOS ANIMALES

Fanjul, M.L.; Hiriart, M. y Fernández de Miguel, F. (1998). SIGLO XXI Editores S.A.México D.F.; ISBN: 968-23-2136-0. Con un tiraje de 2000 ejemplares

A finales de 1998 el Dr Rafael Pérez Pascual, Director de la Facultad de Ciencias de la UNAM, presentó el libro: "Biología Funcional de los Animales", editado por la Dra María Luisa Fanjul, profesora de la Facultad de Ciencias y la Dra Marcia Hiriart y el Dr Francisco Fernández de Miguel, ambos investigadores del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El libro fue coeditado

por la Facultad de Ciencias de la UNAM y Siglo XXI Editores SA.

A lo largo de 14 capítulos los editores junto con otros coautores revisan conceptos como la establilidad interna (homeostasis y homeorresis), transporte a través de membranas biológicas, excitabilidad, neurotransmisión, funcionamiento muscular, regulación neuroendócrina. sistemas sensoriales y visuales, conducta y control motor, respiración y circualación, regulación de la temperatura, excreción y osmoregulación. Es por tanto un libro de texto fundamentado en la fisiología y desarollado con un enfoque biológico, más que clínico o puramente básico, como reconoce en

el prólogo la Dra Herminia Pasantes, Investigador Emérito de la UNAM. En palabras de la Dra Fanjul, el libro "se propone dar un panorama muy general de la fisiología de los diferentes animales dentro de un contexto ambiental". Se revisan los mecanismos de control que dan sustento a la fisiología y que hacen posible mantener un medio interno estable y que al mismo tiempo permite adaptarse tanto a cambios programados dentro del ciclo de vida de los animales como a cambios adaptativos a circunstancias inesperadas. Todo esto hace que el libro sea de gran utilidad en cursos de fisiología como una lectura complementaria o incluso como libro de texto. Adicionalmente, muchos de los ejemplos discutidos pueden dar una mejor comprensión de la importancia biológica de

los procesos que se revisan en cursos de bioquímica, por lo que el libro también puede ser empleado como material de apoyo en cursos de bioquímica.

Biología funcional de los animales

María Luisa Fanjul Marcia Hinart Francisco Fernández de Miguel

(editores)

CONTENIDO: Capítulo 1: La

Capítulo 1: La doctora María Luisa Fanjul y la Dra Marcia Hiriart revisan los conceptos de homeostasis y adaptación.

Capítulo 2: La Dra Lourdes Massieu revisa las estrategias que les permiten a los animales mantener el equilibrio en el contenido de sales de sus células y líquidos corporales con su medio ambiente.

Capítulo 3 y 4: El Dr Francisco Fernández de Miguel revisa los mecanismos electrofisiológicos que permiten generar

actividad electrica espontanea o en respuesta a estímulos. Y en un capítulo separado los mecanismos que controlan la transmición sináptica eléctrica y neuroquímica.

Capítulo 5: La Dra Hortensia González describe las propiedades estructurales y funcionales de la contracción muscular y su interacción con neuronas motoras.

Capítulo 6: La Dra Marcia Hiriart describe los elementos de los sistemas endócrinos y neuroendócrinos y los ejemplos más relevantes en distintos tipos de animales.

Capítulo 7: La Dra Beatriz Fuentes y el Dr Enrique Moreno describen las generalidades de los sistemas sensoriales, los sistemas de receptores, las vías aferentes y los sistemas de integración.

Capítulo 8: El Dr Jorge Pérez León y la Dra Rocio Salcedo revisan los elementos de recepción de luz y los sistemas de condución e integración del estímulo visual en vertebrados y en invertebrados.

Capítulo 9: La Dra Hortensia González y el Dr Francisco González de Miguel describen las similitudes y diferencias en los tipos de redes y circuitos neuronales responsables de los patrones de conducta motora.

Capítulo 10: La Dra María Luisa Fanjul describe a nivel organístico los sistemas de intercambio de oxígeno por bióxido de carbono y se discuten algunos aspectos del metabolismo de diferentes organismos.

Capítulo 11: La Dra Marcia Hiriart describe la estructura y regulación del sistema que controla la circulación de fuidos.

Capítulo 12: La Dra María Luisa Fanjul describe los mecanismos fisiológicos que resuelven el problema de mantener la temperatura corporal

Capítulo 13: La Dra Beatriz Fuentes y el Dr Enrique Moreno describen los sistemas de excreción que permiten mantener el equilibrio iónico, el volumen corporal y las concentraciones de sales que establecen el equilibrio osótico, eliminar los productos finales del metabolismo y eliminar productos extraños.

Capítulo 14: La Dra Lourdes Massieu discute algunos de los mecanismos que le han permitido a diferentes animales mantener su balance osmótico en distintos habitats.

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

UN AGRADECIMIENTO A LA SRA ELISA MORA DE SALLES

La finalidad de esta nota es la de hacer un reconocimiento a la Sra Elisa Mora por el tiempo dedicado al Boletín de Educación Bioquímica. Cada uno de los miembros del Consejo Editorial ya le hemos expresado personalmente diferentes motivos de agradecimiento, parte de ellos se refieren a su capacidad profesional y a su entrega. Yo quise aprovechar estas líneas para expresar un punto de vista personal y a la vez una visión más humana de lo que ha significado para mí el conocer y trabajar al lado de la Sra Mora.

La Sra Mora siempre me ha brindado una amistad que rebasa los ámbitos laborales, me ha aconsejado, sin permitir que yo me dé cuenta de ello. Me ha dado la inmensa ganancia de contrastar mis ideas, sin hacerme sentir que me equivoqué, cuando ese es el caso. Siempre encuentra un lado bueno a los problemas y los hace parecer menos graves y hasta encuentra las frases adecuadas para aminorar los malos ratos. Siempre está de buen humor y dispuesta a conversar de todo. Nunca hay una queja abierta y cruda, por el contrario, el planteamiento de una situación problemática lo acompaña de posibles soluciones. Me ha consolado cuando encontramos un problema sin solución y me alerta cuando la solución puede ser otra. Tiene una fe inmensa en la juventud y en las instituciones y piensa que la mezcla de entusiasmo y experiencia no tiene limites. Casi siempre sabe lo que debe hacerse y de las necesidades de las otras personas, lo que le permite adelantarse a miles de situaciones.

Parecería que me estoy dedicando a decir solamente cosas buenas; sin embargo, los que la conocen y han trabajado con ella no me dejarán mentir y de cualquier manera ¡yo qué gano con mentirles! pero también tiene defectitos, por ejemplo: quién como ella para pelear sutilmente con los impresores, haciéndolos sentir que les pide un favor cuando en verdad los está criticando y forzando a hacer bien su trabajo. Citando a los miembros del Consejo Editorial, de manera elegante y amigable, pero dejando en claro la necesidad de su puntual asistencia. Sirviendo de intermediario entre el editor en jefe y los editores, presionando fuertemente al primero y apurando amigablemente a los otros. Ofreciendo con unos dulces y algunas galletas sus pun-



La señora Elisa Mora de Salles, en la Facultad de Medicina.

tos de vista contrastantes, como diciendo: "y esto qué, ¿no lo van a tomar en cuenta?". Armonizando puntos de vista con una encantadora sonrisa y dejando ver con una mirada su desacuerdo o con un leve gesto su aprobación. Desapareciendo de manera imperceptible cuando no quiere dar un punto de vista en alguna polémica y prefiere dejar, inteligentemente, que las corrientes tomen su rumbo. Es decir, haciendo su trabajo y haciendo trabajar a otros con los múltiples recursos de toda una dama.

Con todo lo mencionado anteriormente es evidente que la voy a extrañar caminando por los pasillos de su adorada Facultad de Medicina, teniendo todo listo para las agradables juntas de trabajo en el Departamento de Bioquímica y llamándome por teléfono para hacerme ver la belleza de la vida y después martirizarme poniéndome a trabajar por fax, correo electrónico o mensajería. Sin embargo, estoy seguro que no me privará del resto de sus características, porque me prometió que seguiremos siendo amigos y tal vez hasta algún día le pueda robar una invitación a comer para disfrutar de su plática -- y de la de su esposo, ya que toda su familia es excelente anfitriona-, donde seguramente me presumirá de todas sus actividades, sus nuevos provectos y nuevas realizaciones, contagiándome un poco de su alegría de vivir.

José Víctor Calderón Salinas

LA FALTA DE MOTIVACIÓN COMO MECANISMO DE SELECCIÓN NATURAL EN EL PROCESO DE EVOLUCIÓN DENTRO DE LOS PROGRAMAS DE POSGRADO

Retomando el concepto de motivación que se manejó en el editorial del número 4, volumen 16 del Boletín de Educación Bioquímica, yo tengo mi propia idea de este concepto: motivación es algo que anima a realizar algún trabajo que nos interesa, con las ganas de hacerlo bien y sobre todo disfrutar lo que se está haciendo. Creo que también tiene que ver con la vocación, concepto que es difícil de definir, y que desde mi particular punto de vista, considero que es primordial estar convencidos que lo que hacemos, lo hacemos porque es lo que nos interesa y nos gusta para poder de verdad disfrutar de nuestro trabajo.

Desafortunadamente somos muy pocas las personas que podemos decir esto, ya que la mayoría de la gente hace su trabajo porque no les queda de otra y porque sólo de esta manera pueden obtener ingresos para poder mantenerse, ellos y a su familia, cuando ya tienen esa responsabilidad.

Pero regresando al tema de la motivación en los programas de posgrado, creo que en principio la motivación del estudiante, sí existe, sobre todo de los compañeros que, como ellos mismos dicen, sobrevivieron a las presiones, desánimos y desalientos a los que tuvieron que enfrentarse. Desde que empiezan los cursos uno sabe que ya no es como en la licenciatura y que en el posgrado nos enfrentamos a un nivel de complejidad mayor, que tenemos que ser más responsables, trabajar y esforzarnos mucho para poder salir adelante en este ambiente, pero lo curioso es que casi nadie nos lo dice, tal vez porque los profesores dan por hecho que ya lo sabemos.

Creo que desde ahí se nota la falta de interés y de motivación. En el tiempo que llevo de cursos han sido muy pocas las personas, incluyendo a los profesores, que nos han brindado un ratito de su tiempo para motivarnos, que nos han dicho que todo es cuestión de esforzarse para lograr el objetivo de terminar el doctorado.

Nota enviada por la autora como una reflexión, motivada por un editorial y un artículo que aparecieron en el volumen 16 del Boletín de Educación Bioquímica.

Por si fuera poco, aparte de sufrir las presiones y la falta de motivación, tenemos que sobrellevar las frustraciones. En lo personal, desde el principio de los cursos del posgrado en el que estoy, no he visto reflejado ese esfuerzo, no obstante que he puesto todo el empeño en estudiar y de que estoy superconvencida de querer terminar el doctorado, pero sobre todo de dedicarme, al término de mis estudios, a la investigación.

Estoy totalmente de acuerdo que no sólo con la motivación se puede llegar a la meta, porque no por el simple hecho de querer hacer las cosas, se van a realizar por sí solas y aunque el dicho diga que "querer es poder" se necesita trabajar muy duro para poder salir adelante, sea cual sea el trabajo que desempeñemos y por lo que me he podido dar cuenta, esto es mucho más válido en el ambiente de la investigación.

Es verdad, la investigación es una actividad muy absorbente, muy demandante, en la que se nos exige mucho y aunado con la falta de motivación y más que nada con la frustración que muchas veces el sistema educativo nos hace sentir, se convierte en una carga realmente pesada. Por dar un ejemplo de fallas en la motivación e incremento en la frustración: muchos profesores creen que una calificación refleja de manera directamente proporcional el conocimiento y, peor aun, la capacidad de una persona; y yo no estoy de acuerdo con eso, ya que esto depende de múltiples factores, que la mayoría de las veces no son analizados.

Muchas veces, como ya lo he mencionado, aunque uno estudie, por cualquier circunstancia se puede fallar y salir mal en un examen y tanto los compañeros como algunos profesores piensan o por lo menos nos hacen sentir que no podemos con el paquete; tal vez esa sea la forma de motivar, es decir, te hacen sentir mal y de esta manera o te esfuerzas más o si sientes que no puedes, tienes que renunciar. Eso para mí es frustrante y he empezado a sentir de verdad una gran desilusión y a dudar de mi capacidad, pero me resisto a creer que no puedo.

Lo anterior me recordó lo que se menciona en el artículo "La teoría de la evolución no es un decre-

to", que apareció en el número 1, volumen 16 del Boletín de Educación Bioquímica: "sólo sobrevive el más fuerte, el más apto y capaz". Estos comentarios son muy personales, pero sé que muchos de mis compañeros comparten mi opinión, esto no es una queja, tampoco quiero parecer una mártir, sobre todo porque sigo convencida (a pesar de los descalabros) que esto es lo que quiero y si de lo que se trata es de sobrevivir, espero tener la capacidad suficiente, adaptarme al medio y después, no sólo sobrevivir sino sobresalir por mi trabajo en el ambiente de la investigación; sólo pido al igual que mis compañeros la oportunidad de poder demostrar nuestra capacidad y que no sólo somos una calificación, aquí es donde juegan un papel importante los profesores en el proceso de motivación y en el proceso educativo en general.

Por otro lado, creo que es importante hacer algo para cambiar el sistema educativo, sé que es difícil porque se tendría que hacerlo desde los primeros niveles (primaria y secundaria), mejorar los planes de estudio, preparar a las nuevas generaciones para que puedan solucionar los problemas a los que se enfrentarán en el futuro.

Considero importante también que hay que empezar a trabajar con los niños, hacerles entender que a pesar de las deficiencias de los recursos materiales y educativos del país, somos capaces de competir y sobresalir y de algo que creo nos debemos de deshacer es del malinchismo, al que desafortunadamente estamos tan acostumbrados, principalmente del que se capta por la televisión, en donde hacen pensar que, por ejemplo, determinado estilo de vida (en especial el de los Estados Unidos de Norteamérica) es el ideal y que todo lo que se hace en México no sirve o no vale la pena.

Desarrollar en ellos una conciencia crítica de la educación que reciben, pero que no sólo la critiquen, sino que la mejoren, que sean capaces desde pequeños a razonar el por qué de las cosas y a quitarles la mala costumbre de memorizar, para que no les pase lo que a muchos de nosotros, que sólo cuando llegamos a niveles tan altos como el posgrado, nos damos cuenta de las deficiencias que traemos arrastrando y que ni el hecho de haber terminado una carrera universitaria garantiza un buen nivel educativo y sí, la mayoría de las veces, una educación mediocre.

Además de fomentarles la lectura y por qué no, una formación autodidacta para complementar su educación, promocionar con ellos las carreras relacionadas con el ambiente de la investigación científica, para que se enteren de lo interesante y fascinante que tienen estas carreras, ya que si esto se lograra, México tendría la capacidad de desarrollar una cultura científica capaz de sobresalir mundialmente y estar a la vanguardia en la investigación y no retrasado y a expensas de otros países como en la actualidad.

Desafortunadamente, en la sociedad mexicana no estamos acostumbrados a pensar en las carreras científicas como una opción, ya que siempre nos dejamos influenciar por la carrera que está de moda, la que nos asegura un trabajo sin necesidad de batallar tanto en encontrarlo; pero sobre todo, de la que podemos obtener un buen sueldo y, como es muy bien sabido, la investigación en México no es una opción, ya que no es apoyada como se debería, lo que repercute en el bajo salario de un investigador.

Tal vez suene a utopía, pero tengo la esperanza de que algún día todo lo anterior pueda llevarse a cabo y yo poder contribuir en algo para que se haga realidad.

Adriana Hernández Angeles Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias Centro de Investigación y Estudios Avanzados

SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA del 9 al 13 de agosto de 1999

SEGUNDO AVISO SOBRE EL XXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

A todos los profesores de Bioquímica del país:

Se les informa que el próximo **XXVI Taller de Actualización Bioquímica** se realizará del 9 al 12 de agosto del año en curso. Durante este Taller se cubrirán los temas que se muestran en el calendario anexo. La sede es la Ciudad de México.

Atentamente El Comité Organizador

Marco A. Juárez Oropeza (majo@servidor.unam.mx), Tel: 623-21-69 Juan Pablo Pardo Vázquez (pardov@servidor.unam.mx), Tel: 623-25-10 Sara Morales López (saramolo@servidor.unam.mx), Tel: 623-21-68 Federico Martínez Montes (fedem@servidor.unam.mx), Tel: 623-24-08 Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM Fax: 616-24-19

RUMBO AL VII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, AC

Segunda Convocatoria

En los acuerdos tomados en la sesión de negocios celebrada durante el VI Congreso de nuestra Asociación se convoca a los Profesores de Bioquímica y Areas afines a participar con trabajos libres en el VII Congreso de nuestra Asociación que se llevará a cabo el 13 de agosto, después del XXVI Taller de Actualización Bioquímica, que organiza el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Informes:

Dr Alejandro Zentella Dehesa Depto Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular de la UNAM AP 70-243 México DF. 045010 México Tel: (5) 622-56-09; FAX: (5) 622-56-11 email: azentell@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

XXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA VII Congreso de nuestra Asociación del 9 al 13 de agosto de 1999

	Ceremonia de Clausura.	14			
	Taller de Ras-Mol y modelaje de moléculas por computadora. Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Marco Antonio Juárez.	Taller de Ras-Mol y modelaje de moléculas por computadora. Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Marco Antonio Juárez.	Taller de Ras-Mol y modelaje de móléculas por computadora. Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Marco Antonio Juárez.	Taller de Ras-Mol y modelaje de moléculas por computadora. Juan Pablo Pardo, Federico Martínez y Marco Antonio Juárez.	16:00 a 19:00
		COMER	RECESO PARA COMER		
					14:00
	isadai Hernánd	Rafael Villalobos Molina	Camarena Camarena	Soto	מ
	Degradación y metabolismo	Los receptores adrenérgicos	erias fijadı	Síndrome de Inmuno-	12:30
			RECESO		
					12:15
	bioquímica. Francisco Javier Flores Murrieta	Vacilio	Escamilla	Garza Flores	מ
	s fármacos co	Adhesión celular. Felipe	La cadena respiratoria	Acción diversa de las	10:45
			RECESO		
2					10:30
AMTB		Ciefairaio Cairai Cairairea	raido vazquez	Ciclos hormonales en	9:15
Congreso de la	Cinética de compartimientos. Héctor Riveros Rosas	Aspectos metabólicos y genéticos del cáncer.	Los complejos respiratorios mitocondriales. Juan Pablo	Inauguración	9:00 a 9:15
				Inscripción	8:00
VIERNES 13	JUEVES 12	MIÉRCOLES 11	MARTES 10	LUNES 9	HORA



POSGRADO DE PECIALIZACIÓN EN

ONVOCATORI

La Facultad de Química en colaboración con la Secretaría de Salud, convoca al programa de posgrado de Especialización en Bioquímica Clínica para la formación de recursos humanos de alto nivel en el Laboratorio Clínico.

REQUISITOS DE INGRESO

Título de Químico Farmacéutico Biólogo, Químico Bacteriólogo y Parasitólogo, Médico, Biólogo o de Carreras afines.

ENTREVISTAS

Miércoles 2 y 9 de diciembre de 1998 a las 16:00 hs. Laboratorio I/D, primer piso edificio "A", Facultad de Química, UNAM.

EXAMEN: 12 de enero de 1999.

Departamento de Biología Facultad de Química, UNAM Ciudad Universitaria, México, D. F. INICIO DE CURSOS: 1o. de febrero de 1999

: 622 3740 y 622 3696 A LOS LECTORES DEL BOLETÍN

DONATIVO ANUAL 1999

DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

El BEB entra en su décimo octavo 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 (docientos pesos) o bien \$20.00 US dólares, que hará posible continuar con la elaboración y distribución del volumen 18 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

¿TE INTERESARÍA SER CORRESPONSAI DEL BEB EN TU LOCALIDAD?

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A C o suscriptor del BEB y radicas fuera de la Ciudad de México o de su zona conurbada, TÚ PODRÍAS SER UN CORRESPONSAL DEL BEB. Nos gustaría contar con uno o varios corresponsales adscritos a las instituciones de Educación Superior de cada estado de la República Mexicana que nos permitan saber quiénes conforman la comunidad académica de la región y conocer las noticias y las actividades más relevantes que ocurran o vayan a ocurrir en su localidad o región (congresos, cursos, seminarios, necesidades de recursos humanos y materiales y otras noticias o acontecimientos de tipo académico). Oueremos hacer extensiva esta invitación a nuestros colegas de Centro y Sudamérica, así como de otros países de habla hispana.

¿Te ha interesado esta invitación? Entonces envíanos tu propuesta directamente al Coordinador de Corresponsales, Comité Editorial del BEB, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF, MEXICO. O bien al Fax (525) 616 2419 o al correo electrónico sersan@servidor.unam.mx.

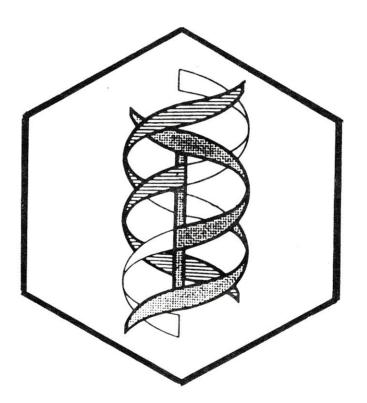
> Atentamente Sergio Sánchez Esquivel, Coord de Corresponsales del Comité Editorial del BEB

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (B E B) COMITE EDITORIAL

ACTUALIZACION DE LOS DATOS DE LOS SUSCRIPTORES

Por favor sea tan amable de llenarlo a máquina y enviarlo a la brevedad posible al APARTADO POSTAL 70-281, Coyoacán 04510, D.F. o por FAX al siguiente número: 616-24-19

NOMBRE CO	MPLETO:	Apellido paterno		
		Nombre(s)		
DOMICILIO:	Calle		Número	Apdo Postal
	Colonia			
	Delegación	n o municipio		
	Ciudad			
	Estado			
	País			
TELEFONOS	Y FAX:	Domicilio		
INSTITUCION DONDE TRABAJA				
		*		
Nombramiento				•
FIRMA			FECHA:	



INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

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. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en los procesadores de textos "Winword" o "Wordperfect", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Éste deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo.
- 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 últimas 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 Willey 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 M M (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 impresiones láser 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 alguna de las publicadas en los números de 1995.

- Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.
- Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

II. OTRAS COMUNICACIONES

- 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, etcétera.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita:
- 3) El trabajo deberá enviarse igual que como se específica en el inciso I-1.
- 4) Se aceptará 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 I₂4.

Los manuscritos serán leídos por tres 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 tres copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal del BEB en su localidad.

BEB 99 Vol 18 Núm 1 Marzo de 1999

CONTENIDO

EDITORIAL	UN AGRADECIMIENTO A LA SRA ELISA MORA DE SALLES
INTEGRACIÓN DE NUEVOS MIEMBROS	José Víctor Calderón Salinas
AL CONSEJO EDITORIAL DEL BEB	Jose Victor Calderon Sannas
Alejandro Zentella Dehesa y	LA FALTA DE MOTIVACIÓN COMO
José Víctor Calderón Salinas	MECANISMO DE SELECCIÓN NATURAL
Jose Victor Calderon Samias	EN EL PROCESO DE EVOLUCIÓN
ARTÍCULOS	DENTRO DE LOS PROGRAMAS DE
ARTICULOS	POSGRADO
LA ELONGACIÓN CELULAR COMO	Adriana Hernández Angeles
UN FENÓMENO ASOCIADO A LA	
GERMINACIÓN EN LAS SEMILLAS	CONVOCATORIAS
Luis Sánchez Linares y	
Marina Gavilanes Ruiz	RUMBO AL XXVI TALLER
	DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
TRANSPLANTE NUCLEAR Y CLONACIÓN	Segundo Aviso
DE ORGANISMOS SUPERIORES	
Raquel Ortega y Fernando Montiel 11	RUMBO AL VII CONGRESO
1 6 7	DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA
METALOTIONEINAS, BIOQUÍMICA	DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, AC
Y FUNCIONES PROPUESTAS	Segunda Convocatoria41
Eduardo Miguel Brambila Colombres y	
Patricia Lozano Zarain	POSGRADO DE ESPECIALIZACIÓN
	EN BIOQUÍMICA CLÍNICA 43
LIPOPOLISACÁRIDOS: EXTRAORDINARIAS	
MOLÉCULAS ACTIVADORAS DE	A LOS LECTORES DEL BOLETÍN
SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN CELULAR	DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA
Carolina Higashida-Guerrero y	Donativo Anual 1998
Gloria Gutiérrez-Venegas	
	¿TE INTERESARÍA SER CORRESPONSAL
OTRAS COMUNICACIONES	DEL BEB EN TU LOCALIDAD? 43
BIOLOGÍA FUNCIONAL DE	INSTRUCCIONES PARA LOS
LOS ANIMALES	COLABORADORES DEL BOLETÍN
Alejandro Zentella Dehesa36	DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 44