

BIOLOGÍA MOLECULAR

F. Jacob, J. Monod, M. Calvin, E. Tatum,
J. Brachet, I. Prigogine y otros



muy
INTERESANTE

BIBLIOTECA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

*Biblioteca
de Divulgación Científica*



BIOLOGÍA MOLECULAR

(SÉLECCIONES DE *LA RECHERCHE*)

FRANÇOIS JACOB	DANIEL BLANGY
JACQUES MONOD	ALAIN BUSSARD
MELVIN CALVIN	JEAN-PIERRE
EDWARD L. TATUM	CHANGEUX
JEAN BRACHET	PIERRE THUILLIER
ILLYA PRIGOGINE	PIERRE VOLFIN

BIOLOGÍA MOLECULAR
(SELECCIONES DE *LA RECHERCHE*)

EDICIONES ORBIS, S.A.

Título original: *LA RECHERCHE en biologie moleculaire*
Traducción: M.^a José Isla Cembrana
Revisión: Juan Diego Pérez González (biólogo)

Asesor científico de la colección: Pedro Puigdoménech
Director editorial: Virgilio Ortega

- © Société d'Éditions Scientifiques, 1975
- © Hermann Blume Ediciones, 1976
- © Por la presente edición, Ediciones Orbis, S.A., 1985
Apartado de Correos 35432, Barcelona
- © Foto portada: Tony Stone Worldwide/Fototeca

ISBN: 84-7634-331-0

D.L.: B. 37587-1985

Impreso y encuadernado por
printer industria gráfica sa provenza 388 08025 barcelona
sant vicenç dels horts 1985

Printed in Spain

INDICE

	Pág.
Presentación	9
1 Cómo nació la biología molecular por Pierre Thuillier	17
2 Las fronteras de la biología por Jacques Monod	39
3 Biología molecular, la próxima etapa por François Jacob	57
4 La biología molecular y el porvenir de la medicina por Edward L. Tatum	67
5 Un mecanismo molecular que regula la vida Las interacciones alostéricas por Changeux y D. Blangy	87
6 La mitocondria: Central energética de la célula por Pierre Volfin	107
7 El origen celular de los anticuerpos por Alain Bussard	137
8 Embriología molecular y diferenciación celular por Jean Brachet	165
9 El origen de la vida por Melvin Calvin	203
10 La termodinámica de la vida por Illya Prigogine	225
Bibliografía	253

PRESENTACION

Raros son en la historia de las ciencias los ejemplos de períodos tan fructíferos como el que lleva al descubrimiento de la doble hélice del ADN por Watson y Crick, en 1952; a los trabajos que les valieron en 1965 el premio Nobel de fisiología y de medicina a Jacob, Lwoff y Monod. Como testimonio el desencadenamiento de literatura epistemológica y filosófica que resultó, la biología conoció en el curso de esta prodigiosa década una verdadera "revolución científica", a juicio de Kuhn: paso radical de una problemática clásica a una problemática nueva —de la que no se había visto el equivalente desde la doble revolución de la física a principios de siglo.

Mientras que de la misma manera en física la esperanza de una extensa síntesis de nuevas teorías, que igualó en solidez y sobrepasó en amplitud al antiguo edificio newtoniano, había dado lugar a una multiplicidad de investigaciones más profundas pero también más disociadas unas de otras (lo que daba en casi nulidad muchas de las proclamaciones filosóficas demasiado seguras ya de ellas mismas, ya de la ciencia de la que se valían), igualmente la biología parece haberse comprometido, para volver a tomar el término de Bachelard, en una larga aventura de "refundición", en la que la realidad de una investigación frecuentemente apenas menos dispersa, fragmentaria que en física oscurece el ideal grandioso de hace poco: el de un cuadro científico y filosófico único, capaz de recoger y poner en orden toda la riqueza de los conocimientos biológicos adquiridos. Hoy, diciéndolo crudamente, el problema del "secreto" de la vida no parece estar más cerca apenas de ser resuelto que el de la constitución "última" de la materia.

Nada podría servir mejor al lector, biólogo o no, de introducción a estas cuestiones que una recopilación de artículos de la revista *La Recherche* (anteriormente *Atomes*): no encontrará solamente un precioso cuadro de la biología molecular y su historia en estos diez artículos reunidos, sino también, y de cada autor, reflexiones de orden general

—algunas de las cuales conviene leer con prudencia, teniendo en cuenta sus fechas y confrontándolas entre sí, pero que de entrada nos envían a los problemas antes mencionados. Quizás sea éste el principal mérito de las revistas de alta divulgación que "por ejercer más influencia sobre los estudiantes y los jóvenes investigadores que las revistas especializadas y los "textbooks" los cuales, si bien responden a las normas más estrictas desde el punto de vista científico, se revelan por esto mismo menos estimulantes para la mayoría de los lectores: esto es lo que apunta Pierre Thuillier en el artículo "Cómo nació la biología molecular", que abre el compendio.

Dar una perspectiva histórica era indispensable de todos modos. La de Pierre Thuillier tiene la ventaja de sobrepasar ampliamente el nivel anecdótico y de mostrar claramente que una revolución científica como la que nos ocupa no sucede ni por ningún azar milagroso, ni por ninguna necesidad de progreso que estaría escrita desde siempre en el espíritu humano. De tal manera que el establecer, en 1958, el "dogma central" de la biología molecular era continuación de un largo proceso de confrontación entre diferentes corrientes del pensamiento biológico (vitalismo y mecanicismo o, con más precisión, informacionismo y estructuralismo) entre diferentes disciplinas científicas (se verá el papel jugado, directamente o no, por los físicos y los químicos en esta revolución de la biología), entre diferentes temperamentos individuales, entre diferentes posturas filosóficas —con la realidad social entera en segundo término. Sin un retroceso histórico mayor, es muy difícil juzgar cuál es la parte de los diversos protagonistas en el producto final (la biología molecular como disciplina constituida); tanto que este proceso, lejos de quedar relegado en la prehistoria para siempre, deja por el contrario una huella durable: subsiste todavía hoy, por ejemplo, una importante diferencia entre el punto de vista genético y el punto de vista bioquímico. ¿Cómo dudar que esta huella del pasado sea llamada a pesar sobre la constitución futura de nuevos "paradigmas", de inéditas problemáticas científicas?

A tal señor, tal honor: a esta exposición introductoria le siguen inmediatamente dos artículos ("Las fronteras de la biología" y "Biología molecular, la próxima etapa"), debidos respectivamente a los profesores Monod y Jacob. No nos ha parecido inútil tomar, del primero, las páginas de su célebre libro, el *Azar y la Necesidad*, que la Recherche había dado a sus lectores en previa publicación. La lectura de estos extractos no sabría reemplazar la de la obra completa, para quien quiera comprender en profundidad las controversias a las que ésta ha dado lugar; pero basta para mostrar hasta qué punto, en el pensamiento de un gran sabio, el

conocimiento de los hechos científicos remite directamente a "desarrollos de orden ético, si no político", como indica Jacques Monod en su prefacio.

El artículo de François Jacob, si no está sacado de la obra (*La Lógica de lo viviente*) que a los ojos del público hace de alguna manera pareja con la de Jacques Monod, completa de forma no menos notoria el artículo precedente. En él se verá expuesta sin rodeos la tesis según la cual el conocimiento profundo de los organismos superiores puede y debe edificarse sobre la base de las experiencias de la biología molecular que atañen a los mecanismos elementales. Como tampoco admite J. Monod para el estudio del sistema nervioso central, F. Jacob no admite, para el estudio del programa genético que regula el desarrollo y el funcionamiento de los organismos superiores, la idea de que unas vías de acceso esencialmente diferentes puedan revelarse necesarias. Y de hecho si esta posición audaz es atacada por algunos como "reduccionista", no aparece por ello como menos sólida a la vista de los notables trabajos que ha permitido.

Se encontrará en el artículo de Edward L. Tatum, "La biología molecular y el futuro de la medicina", el mismo carácter de audacia propio de la mayoría de los investigadores en biología molecular, pero revestido aquí de un optimismo que parece retrospectivamente un poco exagerado. E.L. Tatum, en efecto, cree posible fundar sobre los conocimientos proporcionados por la biología molecular más o menos toda la nueva medicina, y nos promete para los años comprendidos entre 1980 y 1990 gigantescos progresos en un gran número de campos esenciales, desde la cancerología hasta la psiquiatría, sin hablar de las intervenciones eugenésicas que entrevé y preconiza. Sin que la calidad propiamente científica de su artículo sea por esto puesta en entredicho, parece claro hoy que el solo hecho de que profecías tan temerarias hayan podido surgir sin chocar indica una cierta debilidad —correlativa a su aparente poder— de la filosofía subyacente al razonamiento de la biología molecular en su período triunfante.

Los artículos que siguen son más estrictamente científicos. El lector atento no dejará de advertir la acción de postulados epistemológicos que, según el caso, son parte integrante de esta "nueva filosofía biológica" o al contrario se apartan de ella y parecen indicar la necesidad de nuevas vías. El artículo de Jean-Pierre Changeux y de Daniel Blangy, "Un mecanismo molecular que regula la vida: las interacciones alostéricas", es una excelente ilustración del primer caso: en él se verá funcionar el principio de reducción de la función a la estructura, que está en el corazón de la

biología molecular, con una extraordinaria eficacia. Como indica el último párrafo, que trata de las extensiones posibles de esta gestión al estudio del sistema nervioso (eco directo de las preocupaciones expuestas más arriba por Jacques Monod), este principio científico es difícil de disociar de la tesis filosófica según la cual todos los procesos biológicos son determinados integralmente por procesos moleculares (esto es, físico-químicos) simples.

El artículo de Pierre Volfin, "La mitocondria: central energética de la célula", parece escapar en una buena parte a esta problemática implícita. No porque P. Volfin no se sirva tanto como los autores precedentes del conjunto de conceptos esenciales a la biología molecular; pero puede ser que en la medida en que no se trata aquí solamente de transmisión de información sino también de cuestiones energéticas, tanto como en la medida en que los procesos descritos no toman sentido más que llevados a ciclos complejos, se ve constantemente remitido a estudiar la acción de entidades biológicas de un nivel superior al de las macromoléculas. Sin duda, se trata siempre, idealmente, de llegar a una comprensión exhaustiva de todos los mecanismos elementales que están en la obra; pero aparecen constantemente puntos en los que esta comprensión nos falla y donde el estudio científico debe hacerse a otros niveles, sin que se pueda mantener como seguro que se trata de un simple retraso cuantitativo en nuestro conocimiento, destinado a ser satisfecho. También, sin que exista por ello contradicción entre estos trabajos y aquellos de los que tratan los artículos precedentes, la perspectiva general que los inspira no es la misma: es difícil imaginar a P. Volfin terminando su artículo con una profesión de optimismo referente a la posibilidad de reducir todos los fenómenos biológicos a sus componentes físico-químicos; pues justamente de las cuestiones sobre las cuales él nos habla, la ciencia no ha llegado más que de manera imperfecta, la solución aportada a tal problema cada vez parece aportar, más que otra cosa, nuevos problemas. Señalemos todavía esto: si las mitocondrias, como parece, deben ser consideradas como "la consecuencia genética de la existencia, al principio, de microorganismos, parásitos del citoplasma de su célula huésped", esto lleva a situarse a un nivel evolutivo complejo, donde la biología molecular continúa, sin lugar a dudas, prestando eminentes servicios, pero no parece constituir la llave de todo el universo biológico.

El artículo de Alain Bussard, "El origen celular de los anticuerpos", es, bajo esta relación, aún más notable, ya que estos problemas epistemológicos son claramente abordados por fin. A. Bussard no descarta, en

efecto, la hipótesis que le ha fallado, para responder a los problemas que plantea la inmunología celular, "adoptar nuevas concepciones que, integrando totalmente lo adquirido por la biología molecular, superan a ésta adoptando explicaciones originales". Y citar como aparentemente inoperante en su campo la célebre frase de uno de los padres de la biología molecular, Francis Crick: "Si no entendéis una función, estudiad una estructura". No dejará de ser una sorpresa el constatar a lo largo del artículo cómo, alrededor de cuestiones bien delimitadas, es toda una concepción general de la evolución lo que está en juego.

El artículo de Jean Brachet, "Embriología molecular y diferenciación celular", no es menos sorprendente. Como él indica, "los viejos problemas de otros tiempos continúan planteándose al embriólogo de hoy, pero bajo una forma mucho más concreta". En otros términos, la biología molecular ha permitido a la embriología dar a sus problemas una formulación bastante más precisa y poner a punto los procedimientos técnicos necesarios para verificar experimentalmente tal o cual hipótesis avanzada para dar cuenta de la diferenciación celular; pero no ha transformado fundamentalmente la naturaleza del enigma que nos plantea la morfogénesis de los organismos superiores. Para decirlo todo, la base epistemológica de la biología no está a los ojos de J. Brachet realizada por la revolución reciente; como testimonio de ello está el hecho de que el autor trabajara ya, hace cuarenta y cinco años, "en embriología molecular sin saberlo".

El artículo de Melvin Calvin, "El origen de la vida", nos presenta el conjunto de estos problemas bajo un aspecto bastante diferente. Como lo indicaba J. Monod, en efecto, la biología molecular debe poder, si pretende cubrir en principio el conjunto de las ciencias biológicas, examinar con éxito la cuestión del origen de la vida. M. Calvin describe aquí para nosotros los gigantescos progresos realizados a nivel de las primeras etapas de la emergencia de la vida: la formación de biomonómeros primero, de biopolímeros después cuyas propiedades estereoquímicas ejercen sobre el azar una poderosa presión. Pero es necesario que la etapa siguiente sea comprendida igualmente bien: si en efecto se está casi en condiciones de dar cuenta, sobre estas bases, de la aparición de entidades tales como los virus, en compensación de la constitución de organismos biológicos en el sentido estricto, es decir claramente provistos de membranas que delimitan un interior y un exterior biológicos diferenciables por la existencia de un metabolismo, queda un enigma. La misma cuestión que hemos evocado repetidas veces vuelve a aparecer aquí: la

biología molecular en su forma de pensamiento y en sus técnicas, ¿es una vía de aproximación suficiente para los fenómenos biológicos superiores? Hemos visto que los puntos de vista no eran homogéneos.

El artículo de Ilya Prigogine, "La termodinámica de la vida", con el cual se cierra el conjunto de artículos, es del más alto interés en tanto que, estudiando el problema de la relación entre las leyes de la física y los fenómenos biológicos (problema que había fascinado a todos los primeros investigadores en biología molecular), llegó a conclusiones algo diferentes a las de numerosos biólogos: según él, "no falta razón si se piensa que el fenómeno vida es tan previsible como el estado cristalino o el estado líquido". La razón de este desacuerdo probablemente debe ser menos buscada en la diferencia de puntos de vista de la física y de la biología que en el carácter ampliamente diferenciado del sistema mismo de las ciencias físico-químicas: el punto de vista termodinámico introducido aquí por I. Prigogine le lleva de la manera más natural a conclusiones que el punto de vista estructuralista (en el cual se inspira la biología molecular) no hace aparecer.

Pensamos haber dado a conocer que, si estas cuestiones parecen frecuentemente tan difíciles y embrolladas al profano, esto depende en buena parte de las contradicciones que subsisten, incluso se desarrollan, en el mismo seno de la comunidad de biólogos: puede ser ésta la mejor prueba, si es que hace falta alguna, de que la biología es todavía una ciencia viva y fecunda, en la que los múltiples desarrollos no dejan de plantear nuevas interrogaciones. Quizás el lector, al final de esta obra, se sienta menos intimidado ante las teorías epistemológicas que se fundan en tales o cuales investigaciones biológicas y a veces las gobiernan. Tanto al profano como al biólogo, al filósofo como al historiador de las ciencias, le interesa aclarar lo que ahí se juega, en este enmarañamiento de los avances o de las revoluciones científicas, por una parte, y las concepciones del mundo (y a veces los espejismos filosóficos), por otra. El investigador o el estudiante encontrará en esta reflexión el medio de sobrepasar los límites de una especialización que se ha convertido en ineluctable y de volver a coger las grandes corrientes de pensamiento que animan su disciplina, la epistemología, de comprender mejor cómo se produjo concretamente, y no en las esferas etéreas de una ciencia hipostásica, el progreso científico. Unos y otros encontrarán el medio, finalmente, de estudiar las relaciones complejas de la ciencia con el mundo en cuyo seno surgió.

Queríamos, para terminar, expresar nuestra gratitud a John Stewart, que nos ha brindado una preciosa ayuda en la elección y la apreciación

crítica de los artículos de esta recopilación, así como a Michel Chodkiewicz, director de La Recherche, sin quien este proyecto no habría podido ser llevado a cabo.

El editor francés

1. COMO NACIO LA BIOLOGIA MOLECULAR

Pierre Thuillier

¿Cómo nace una nueva ciencia, una nueva especialidad? . No se ha dado una respuesta a la vez general y satisfactoria a esta pregunta, aunque hayan sido formuladas diversas hipótesis. Joseph Ben-David y Randall Collins, por ejemplo, han estudiado desde un punto de vista sociológico los orígenes de la psicología y han dado la idea siguiente: una nueva disciplina "se desarrolla cuando diversas personas se interesan por una idea nueva no sólo en tanto que tiene un contenido intelectual, sino en tanto que es un medio potencial de establecer una nueva identidad intelectual y en particular un nuevo papel profesional" (1)*.

Esta interpretación es discutible y ha sido discutida, pero tiene el interés de tomar en consideración simultáneamente el aspecto intelectual y el aspecto social del fenómeno estudiado. La evolución que tiene lugar a nivel de las teorías ("hibridación de las ideas") no está separada de su contexto sociológico ("hibridación de roles"). Es en esta doble perspectiva en la que se va a estudiar el caso de la biología molecular. Se trata de una disciplina totalmente joven; pero se dispone desde ahora de documentos y estudios que permiten si no trazar un panorama completo, al menos discernir sobre un ejemplo preciso algunos de los procesos de la práctica científica efectiva. El segundo plano filosófico y epistemológico no se descuidará, pero trataremos de esclarecer particularmente los diversos aspectos sociales del desarrollo de la investigación: cómo se desarrollan las ideas originales en una colectividad dada, cómo se transmite y es recibida la información científica, cómo se organizan y después se institucionalizan las nuevas investigaciones. No obstante, que quede claro que un estudio de este género no pretende explicar el contenido teórico de la biología molecular por su condicionamiento social: se puede reconocer la importancia de este último sin creer, sin embargo, que la nueva disciplina depende de un estricto determinismo socio-histórico.

* Las referencias entre paréntesis remiten a la bibliografía, al final de la obra.

Del romanticismo al academismo

En el punto de partida de una disciplina, hay ideas o embriones de ideas a veces muy vagos; en el punto de llegada, en los casos favorables, se producen fenómenos de *reconocimiento* y de *institucionalización* sin los cuales la disciplina no tiene verdaderamente, en una sociedad dada, el estatuto de ciencia. En abstracto, siempre es posible reducir la historia de la ciencias a la historia de puras ideas, donde inventos y descubrimientos se engendran lógicamente. Pero se trata sin duda de una ficción idealista no verosímil, en la mejor hipótesis, más que retrospectivamente, cuando se pasan por alto las épocas pasadas. La vida real de las ciencias es bastante más rica en paradojas y en incertidumbres, y mucho menos lineal. El ejemplo de la biología molecular es muy característico: no ha nacido de los amorcillos ideales y espontáneos de la física y la biología, sino de un entrecruzamiento complicado de ideas y de investigaciones extremadamente diversas (y a veces incluso contradictorias).

Mullins, en un artículo de *Minerva* (39), ha intentado volver a trazar las diversas etapas que separan la creación del "grupo de fago" (por Max Delbrück a finales del año 1930) de la institucionalización oficial de la biología molecular (hacia 1962). Se refiere con esto a los trabajos de Stent (45), que había distinguido tres grandes periodos:

- Un período *romántico*, que comienza hacia 1935 con las primeras reflexiones de Delbrück sobre las nuevas tareas de la genética. (El adjetivo "romántico" se justifica por razones que aparecerán más tarde).

- Un período *dogmático*, que va desde 1953 a 1963 aproximadamente, dominado por James Watson y Francis Crick y por la enunciación del "dogma central" sobre las funciones del ADN y del ARN. En este período es en el que François Jacob y Jacques Monod amplían la teoría por sus trabajos sobre el ARN mensajero y el operón (lo que constituye, dice Stent, la única gran extensión del "dogma" durante este decenio).

- Finalmente, un período *académico* a partir de 1963, que corresponde a la estabilización del cuadro de investigación. Evidentemente, no están resueltos todos los problemas; por ejemplo, no se sabe cómo se desarrolla la morfogénesis que lleva del huevo fertilizado a la formación de un organismo complejo y en sumo grado diferenciado. Pero los conocimientos sobre los mecanismos moleculares fundamentales son considerados como suficientes para que se pueda *imaginar* cómo los problemas pendientes (morfogénesis, origen de la vida...) deben ser estudiados.

"Paradigmas" y "revoluciones científicas" según T.S. Kuhn

Este esquema ha sido tomado y modificado un poco por Mullins, que lo ha interpretado a la luz de las ideas expuestas por Kuhn en su libro *The Structure of Scientific Revolutions* (34). Por esto último, la vida de las ciencias consiste en una sucesión de "paradigmas", es decir, de cuadros generales en el interior de los cuales se desenvuelven las actividades de investigación en una época dada por una disciplina dada¹. En primer lugar el paradigma no corresponde más que a una nueva idea, a una nueva orientación de las "miras" científicas. Es el momento de innovación teórica: se plantean nuevas *questiones* (es un punto esencial) y se proponen nuevos tipos de *soluciones*. A continuación viene un período de éxito: el paradigma nuevo (por ejemplo, el paradigma newtoniano) manifiesta su valor al aportar respuestas efectivas a algunos problemas no resueltos hasta el presente. Entonces aparece la tercera fase, la que Kuhn designa por la expresión de *puzzle solving*: la colectividad científica interesada *reconoce* el paradigma, es decir, admite que la solución de problemas de cierto tipo debe buscarse refiriéndose a las ideas teóricas enunciadas por el paradigma. Presupone, de alguna manera, que la solución existe y que el trabajo consiste en encontrarla buscando en una dirección bien definida. Esto es lo Kuhn llama ciencia "normal", por oposición a las "revoluciones científicas" que corresponden a la primera fase.

Mullins aplica esta triple distinción en los diversos períodos (romántico, dogmático y académico) que hemos enumerado más arriba. Dicho de otra manera, se sirve del análisis epistemológico de Kuhn para ordenar "la historia vivida" de la biología molecular. Al hacer esto, reconoce que el esquema de Kuhn debe ser manejado con precaución: es una especie de desarrollo ideal, válido sobre el plan lógico, pero que hay que aplicar a la realidad histórica con cierta flexibilidad. Las fechas no proporcionan más que indicaciones aproximadas; naturalmente sería ingenuo creer que toda una colectividad científica entra de la noche al día en una "fase" completamente diferente de la precedente.

El interés del trabajo de Mullins estriba en que pone las etapas del pensamiento teórico en relación con la organización social de los investigadores. Al principio, por definición, la especialidad nueva no existe; y, sin embargo, es necesario prácticamente que se instituya una cierta cooperación para hacer madurar las ideas nuevas. Bajo este punto, es

1. Esta noción de paradigma plantea diversas dificultades. Se le ha reprochado ser demasiado imprecisa. (Ver 429, 2.^a ed. y 431).

comprensible que Mullins haya partido del grupo fago para analizar la historia de la biología molecular. Esta no era, ni mucho menos, la única manera de proceder. Ni Avery ni Chargaff, por ejemplo, han formado parte del grupo fago. Pero admitamos aquí, bajo reserva de un inventario ulterior, la perspectiva adoptada por Mullins.

El "grupo del fago" y su organización progresiva

Con el fin de clarificar con un mínimo de precisión las principales fases del desarrollo, Mullins admite que hay cuatro fases, correspondiente cada una a las características intelectuales y sociales particulares². Sería demasiado largo enumerar todos los rasgos que distinguen las fases, especialmente desde el punto de vista sociológico, pero en resumen el resultado es el siguiente:

• Primera fase: el "grupo del paradigma" (*paradigm group*). Corresponde al período 1935-1945; es el "primer período romántico". La figura central es la de Delbrück, un físico para quien la biología ofrecía a los investigadores problemas nuevos particularmente interesantes.

En los años 30, en Alemania, Delbrück se había interesado en los trabajos de dos biólogos, Timoféeff-Ressovsky y Zimmer, que estudiaban la acción de las radiaciones sobre *Drosophila*. No sólo había tenido con ellos largas discusiones, sino que había decidido, finalmente, consagrarse a la biología cuantitativa y en particular a la genética. En 1935, los tres investigadores publicaron juntos un artículo sobre la mutación y la estructura del gen. Se puede considerar este trabajo interdisciplinario como un símbolo ya que los trabajos de este tipo eran raros en la Alemania de esta época, según testimonio del mismo Zimmer, y, por otra parte, este encuentro de dos disciplinas debía tener importantes consecuencias. Sobre ello Pontecorvo decía en 1958: "En los años que precedieron inmediatamente a la Segunda Guerra Mundial, se produjo una cosa absolutamente nueva: la introducción de ideas (no de técnicas) provenientes de la física en el dominio de la genética(...). Aunque la primera aplicación de las ideas de la física a problemas biológicos particulares no se haya conseguido muy bien, todas las concepciones de la genética teórica han estado después impregnadas de un aroma de física (*with a physycal flavour*)" [10, p. 37].

2. Mullins se refiere, entre otras cosas, a un trabajo de Ben-David (42).

Max Delbrück emigra a los Estados Unidos en 1937³, y Salvador Luria, un bacteriólogo de origen italiano, en 1940. Alrededor de ellos y gracias a ellos nace el grupo del fago, así llamado porque su objetivo inicial era comprender cómo el bacteriófago se reproduce en varias centenas de ejemplares en la célula huésped bacteriana, aproximadamente en media hora. Los investigadores eran pocos (puede ser que una quincena) y dispersos; el grupo no tenía ninguna existencia oficial. Citemos otros nombres, además del de Delbrück: Luria, Anderson, Hershey, Adams, Doermann, Lwoff, Monod, etc. En esta época, no todos los miembros del grupo tenían la misma orientación metodológica, y no tenían tampoco la misma concepción de las relaciones existentes entre la física y la química por una parte y la biología por otra. El grupo del fago no engloba ni mucho menos a todos los investigadores que trabajaban sobre el problema elegido. Por ejemplo, varios investigadores se ponen de acuerdo en 1944 para estudiar una sola bacteria (*Escherichia coli*) y una sola categoría de fagos (la serie T).

● Segunda fase: la "red de comunicaciones" (*network*). Durante el período 1945-1953 ("segundo período romántico"), el problema clave, según una fórmula del Delbrück, es saber "cómo la materia viva hace para registrar y perpetuar su experiencia". Los procesos experimentales se ponen a punto progresivamente (Adams). Algunos piensan que la materia genética del virus está constituida por proteínas; pero, en 1952, Hershey y Chase señalan que no es la cobertura proteica sino el ADN el que tiene una función genética. Su publicación marca un progreso esencial; se puede ver en ella el final de los primeros tanteos. El mundo científico, sin embargo, no percibe inmediatamente la aportación de estos resultados. En Londres, Watson lo hace objeto de una comunicación a un congreso de la *Society for General Microbiology*. Pero él escribirá: "Prácticamente nadie, en una asistencia de más de cuatrocientos microbiólogos, pareció interesado" (52 p. 121).

Sobre el plano sociológico, se asiste a iniciativas que tendrán consecuencias importantes para el porvenir del grupo: en Cold Spring Harbor, Delbrück lanza una "escuela de verano", y se organizan encuentros. Empiezan a formarse nudos en diversos países: en Francia, por ejemplo, en el Instituto Pasteur (alrededor de Lwoff, de Elie Wollman, de Jacob,...), y en Suiza, en el Instituto de Física de la Universidad de Ginebra (alrededor

3. Al *California Institute of Technology*, normalmente llamado Cal Tech.

de Kellenberger y de Weigle), mientras que, en la universidad de Indiana, Luria recluta sus primeros estudiantes, Watson y Delbucco. La "red de comunicación" se extiende y se hace más eficaz; se emprenden vigorosas campañas de reclutamiento. No se sabría insistir demasiado sobre el papel que jugaron en esto las "escuelas de verano": gracias a ellas han sido reclutados investigadores como Evans o Weigle.

Gracias a sus éxitos, la nueva disciplina es reconocida e institucionalizada

● Tercera fase: Mullins, para definir la naturaleza del grupo durante esta fase "dogmática" (1954-1962), habla de un *cluster*, es decir, de un enjambre, de un racimo. Una conciencia común se define, los miembros de un grupo se dan cuenta claramente de su situación y la especificidad de sus investigaciones. Después del trabajo fundamental de Watson y Crick sobre la doble hélice, aparecido en *Nature* en 1953, se formula el "dogma central" (Crick, 1958): la información genética es transmitida de los ácidos nucleicos a las proteínas, y nunca en el sentido inverso. Hasta 1962, los trabajos del grupo sirvieron para precisar y confirmar este dogma⁴.

El reclutamiento es menos fuerte que durante el período precedente, pero la solidaridad del grupo se refuerza. Delbrück organiza excursiones al campo⁵; y encierra a sus estudiantes ("writing expeditions") hasta que hayan escrito el informe pedido... Se confirma cierto estilo de publicación. "No escribáis demasiados artículos"; "No tengáis miedo de decir en ellos demasiado poco al interpretar vuestras experiencias" —tales eran los consejos que daba Max Delbrück. Para hacer la investigación más eficaz, se puso un servicio de información (*Phage Information Service*), que permite seleccionar la información importante y la información trivial — los "signos" y los "ruidos de fondo". La posición de la biología molecular, en suma, se hace cada vez más sólida.

Pero todo sistema tiene sus imperfecciones, y Mullins señala que el grupo del fago tendía a veces a comportarse como una "comunidad religiosa": los miembros del grupo daban una importancia un poco

4. La naturaleza del código genético parece hoy "evidente". Pero antes de que Crick y sus colaboradores propusieran la idea actualmente aceptada (1957), Gamow había propuesto otro código llamado "de imbricación": las dos últimas bases de un triplete constituían las dos primeras del triplete siguiente, etc.
5. Mullins señala que André Lwoff ha partido en una de estas salidas en 1950, por ejemplo.

exclusiva a los trabajos de su colectividad en detrimento de las informaciones y las ideas exteriores. Algunos estudios sobre el fago eran desatendidos. A propósito de la lisogenia, por ejemplo, Elie Wollman formuló este testimonio: "Me acuerdo que una vez, en Cal Tech, encontré en un índice bibliográfico una referencia a uno de los artículos de mis padres (Wollman y Wollman, 1937, 1938). El artículo en cuestión indicaba que no se obtenía ningún fago infeccioso cuando el *Bacillus megatherium* era infectado por el bacteriófago y enseguida lisado por el lisozima. La conclusión de mis padres era que el fago después de la infección entraba en una fase intercelular no infecciosa(...). En la ficha del Cal Tech había este comentario: Sin sentido⁶" (9, p. 216-217).

Por otra parte, sería erróneo atribuir al grupo del fago una gran estabilidad. De hecho, las adhesiones eran por lo general temporales y frecuentemente muy breves. Mullins ha hecho una estadística basada en 111 miembros: de este número, 59 investigadores no han aportado más que una colaboración puntual (por ejemplo un artículo, y en cualquier caso menos de un año de trabajo), y de todos ellos sólo 15 se han quedado más de diez años en el grupo. Incluso si se dejan de lado los 59 colaboradores ocasionales, la duración media de pertenencia al grupo no es más que de seis años. Según Mullins, esto indica que los progresos se han hecho por una serie de contribuciones concretas y no gracias a una acumulación de investigadores que trabajaran largo tiempo en el grupo. Este último era muy "fluido" y al mismo tiempo notablemente activo.

• Cuarta fase: la *especialidad* (es decir, el período "académico"). A partir de 1962, la biología molecular se institucionaliza; es una especialidad reconocida, con una organización formal; los procedimientos oficiales de reclutamiento, las revistas, los centros, disponen de créditos propios, etc. Después de 1966 es difícil seguir el destino del grupo del fago, pues desde ahora está englobado en la biología molecular, cuyo dominio es mucho más vasto. Por la misma razón del éxito conseguido, la empresa pierde sus caracteres distintivos. Como escribía Stent hace ya algunos años, es probable que "la biología molecular se haya convertido ahora en un campo de trabajo prosaico". (Nada impide creer, desde luego, que otros "paradigmas" y otras "redes" estén formándose en las fronteras de la disciplina ahora consagrada: "Ahora que la genética molecular se ha convertido en una disciplina académica, puede esperarse encontrar en la

6. En 1949, declara A. Lwoff, "la lisogenia se había convertido en una herejía" en la escuela virológica americana (24, p. 47).

vanguardia de la investigación biológica a los que estudian el sistema nervioso más que a los genetistas⁷”).

Si se interpreta con precaución, el esquema propuesto por Mullins logra poner en evidencia de manera articulada y bastante convincente los aspectos variados de la génesis de un “paradigma”. Se ha indicado más arriba una crítica posible: todo su relato está centrado en Delbrück y el grupo que ha animado, lo que quizás es arbitrario. Mullins ha visto el problema, y explica él mismo que el grupo del fago no era ni el primero, ni el único: “Bioquímicos como Chargaff, genetistas como Sturtevant, especialistas de química estructural como Pauling o de la cristalografía de los rayos X como Perutz intentaban también determinar la estructura y la función de macromoléculas con interés biológico”. Ello no impide que el caso Delbrück sea especialmente significativo, pues ha expuesto los problemas en términos nuevos.

De Niels Bohr al bacteriófago: el caso de Max Delbrück

Era un físico, y más exactamente un antiguo discípulo de Bohr. Las ideas de este último sobre la biología le habrán chocado mucho. En una conferencia de 1932, el físico danés había declarado: “Constatar la importancia de las propiedades de los átomos en las funciones de los seres vivos no es suficiente para explicar los fenómenos biológicos. El problema es entonces saber si nos falta aún algún dato fundamental antes de comprender la vida sobre la base de la experiencia de la física (...). En este caso, la existencia de la vida debería ser considerada como un hecho elemental sin explicación posible, como un punto de partida para la biología, de la misma manera que el *quantum* de acción que aparece como un elemento irracional para la mecánica clásica constituye con las partículas elementales el fundamento de la física atómica. Nuestra tesis de la imposibilidad de una explicación físico-química de las funciones vitales propiamente dichas podría ser en este sentido la análoga de aquella de la insuficiencia del análisis mecánico para comprender la estabilidad de los átomos” (46, p. 20; 23, p. 265).

La importancia epistemológica de esta idea es evidente. Se comprende que bajo esta influencia Delbrück haya estimado, en un texto de 1935, que “la genética es autónoma y no debe ser mezclada con concepciones

7. Es la opinión expresada por Stent (49, p.8).

físico-químicas". Es verdad que los análisis efectuados sobre *Drosophila* mostraban que los genes eran de una talla comparable a la de las moléculas conocidas más grandes. Pero, para Delbrück, esto no significa de ninguna manera que se pudiera identificar el gen (biológico) y la molécula (química), y de manera general rehusaba considerar como evidente una "reducción" de la biología a la físico-química. Admitía de todas formas que se recurre a la física —"a otras leyes de la física". Se vuelve a encontrar la idea en el libro de Schrödinger (todavía un físico...) que tuvo una gran resonancia al final de la Segunda Guerra Mundial: *¿Qué es la vida?* "De la presentación general que Delbrück da de la sustancia hereditaria, resuelve que la materia viva, aunque no escapa a las leyes de la física tal como las conocemos, es susceptible de poner en juego otras leyes de la física: una vez que sean conocidas, formarían parte de esta ciencia con el mismo título que las precedentes" (44, p. 73).

Verdaderamente, Delbrück tenía una posición todavía más radical, por lo menos si se le juzga por alguno de sus textos. Pues Schrödinger creía firmemente que el "nuevo principio" (la teoría cuántica, en concreto) formaba parte de la física propiamente dicha; imaginaba incluso que un espíritu "laplaciano", al tomar conciencia de la estructura de un huevo, podría prever el ser viviente que de él naciera. Por el contrario, la desconfianza de Delbrück hacia la física era muy grande. El biólogo, explica en 1949, no puede aspirar a encontrar leyes fundamentales como el físico, y toma de Bohr la idea de una *complementariedad* entre la física y la biología, que no es, al parecer, muy clara. Esta complementariedad significa más bien una prolongación de la física que una *irreductibilidad* fundamental⁸. Mientras que Bohr deseaba expresamente evitar a la vez excesos mecanicistas y vitalistas (6, p. 38), Delbrück da la impresión de aceptar un punto de vista próximo al vitalismo. Se lo prohibía expresamente, y sin duda con razón; pero prácticamente tenía una actitud negativa hacia la bioquímica, a la cual juzgaba inútil o muy poco útil. Una célula es más un acontecimiento histórico que físico. Si la vida se explicara por la física, se podrían reproducir en todo momento los fenómenos de "generación espontánea" a partir de la materia inerte. Pero, evocando la larga historia de la vida, objetaba: "No se explica tan fácilmente un pájaro tan viejo y tan lleno de prudencia...". Más aún, aconsejaba formular las

8. Para introducir la idea de "complementariedad" en biología, Bohr insistía en los límites de la observación: "Sin duda mataríamos un animal si intentáramos llevar el estudio de sus órganos hasta determinar el papel de los átomos individuales en sus funciones vitales" (1, p.19).

teorías sobre la célula "sin temer contradecir la física molecular" (9, p. 9s). Por eso se comprende cómo ha podido aplicársele el calificativo de romántico. Se encuentran ideas parecidas en Elsasser: "La vida es un fenómeno *primario* no deducible a partir de la física o de cualquier otra cosa" (16, p. 45; ver también 47).

La idea de información genética

Con el paso del tiempo, puede parecer que la posición del Delbrück no era razonable. Pero la realidad es menos sencilla; sería sin duda injusto no subrayar el aspecto positivo de sus ideas. En el fondo, contra los que planteaban *a priori* que los fenómenos biológicos son completamente explicables en términos de física, Delbrück preservaba los derechos de la biología. Dialécticamente, esto ha sido útil contra el extremismo de los reduccionistas y ha abierto nuevas vías. Si hubo una *revolución* al principio de la biología molecular, probablemente haya que buscarla cerca de Delbrück⁹. A través de sus especulaciones o de especulaciones análogas, la idea de *información* es la que se ha abierto camino. No sólo analizar las estructuras en el sentido físico del término, sino comprender cómo "la experiencia de la materia viva se perpetúa", es decir, cómo se transmite la información genética. Delbrück deseaba "un nuevo camino para la biología", y de hecho, incluso se hizo mal en descuidar la bioquímica, comprendió que hacía falta buscar *otra cosa* que lo que se buscaba hasta entonces. Esta idea de información, a mediados del siglo xx, era todavía una idea nueva; quizás fuera necesario el romanticismo y el anti-bioquimismo de Delbrück para atreverse a proponer, incluso de una forma vaga, un nuevo estilo de pensamiento biológico. La idea esencial es presentada así por Schrödinger: "La fibra cromosómica contiene, cifrada en una especie de código miniatura, todo el porvenir del organismo, de su desarrollo, de su funcionamiento (...). Las estructuras cromosómicas cuentan también con los medios para poner este programa en ejecución. Son a la vez la ley y el poder ejecutivo, el plan del arquitecto y la técnica del constructor" (44, p. 22-23).

En su libro, que hacía explícitamente referencia a los primeros trabajos de Delbrück, Schrödinger sugería también que el cromosoma era un cristal aperiódico. Esto significaba que los átomos que formaban un gen estaban unidos de manera muy estable: "Realmente el gen no es una gota homogénea de líquido. Probablemente sea una gran molécula de proteína". Además, añadía Schrödinger, "el organismo vivo se alimenta de entropía

9. Esta idea es defendida firmemente por G. Stent (45, p. 391).

negativa", que toma de su medio. Así se explicaba el hecho de que "la sustancia hereditaria" estuviera al abrigo de la tendencia al desorden y que el organismo vivo conserve (o acreciente) su nivel de complejidad. Esta concepción también rendía cuentas de las mutaciones provocadas por los rayos X. Estas ideas chocaron mucho a los físicos; marcaban una etapa, y quizás incluso una "revolución", aunque los biólogos no las hubieran tomado todas al pie de la letra¹⁰

Las relaciones entre la vida, la termodinámica y la información

Pero no es fácil establecer el balance de la influencia de Schrödinger. Desde un punto de vista especulativo, el problema que se planteaba era el de la información en el sentido más amplio: no sólo el problema de la información en el sentido estricto, sino también el de la entropía, el de los cambios energéticos, el de la *probabilidad* y del *orden* de la vida. No se trata de negar el interés de esta problemática, que constituye un aspecto importante de la "filosofía" de muchos biólogos moleculares de hoy: los demonios de Maxwell, revisados por Szilard y Brillouin, han ocupado y ocupan siempre un lugar escogido en las reflexiones formuladas por los especialistas al margen de sus investigaciones. Gracias a los conceptos de negaentropía y de información, se ha creado un tipo de lenguaje muy general y susceptible, en principio, de ser comprendido a la vez por los físicos y por los biólogos. La información biológica es considerada entonces como "información" a secas, que a su vez tiene su equivalente en negaentropía. A este vocabulario se han ajustado diversas nociones tomadas de la cibernética y de la teoría de la información (se han constituido en disciplinas específicas después de la aparición del libro de Schrödinger).

Históricamente, es innegable que todas estas corrientes de ideas han tenido como resultado modificar "la imagen" de la biología y atraer la atención de los investigadores a nuevos problemas. Por supuesto, es normal que la biología molecular, nacida del acercamiento entre la física y la biología, sea interrogada sobre el estatuto de los seres vivos con relación al segundo principio de la termodinámica. Parece, sin embargo, que la situación actualmente no es en absoluto clara. Formularemos solamente tres observaciones. La primera consiste en una confesión de impotencia por parte del historiador: como los problemas *más generales*

10. Aunque Schrödinger se haya referido a Delbrück, está claro que su posición es bastante diferente: la idea de "complementariedad" le es extraña y está muy próximo al "reduccionismo".

planteados por la "termodinámica de la vida" no se han resuelto aún, le es prácticamente imposible tomar perspectiva sobre algunos elementos de los que dispone. Es fácil encontrar "precursores" en Galileo o Darwin; es menos fácil saber en qué medida Schrödinger es un "precursor" — ¿y de qué? Es interesante señalar estas declaraciones de André Lwoff: "Algunos físicos a los que he consultado han decidido que la fórmula de Schrödinger era perfectamente aceptable, mientras que otros afirman que no tiene ningún sentido" (35, p. 176).

En segundo lugar, nos parece que las más altas especulaciones sobre "la información" y "la entropía" no son todavía operativas por regla general, en el trabajo de los biólogos moleculares. Son reflexiones marginales que esperan la ocasión de engendrar investigaciones realmente exactas. Se encuentran con más frecuencia en textos sobre biología que en publicaciones de biología molecular.

Por último y correlativamente, no es seguro que la extensión que se ha dado a veces a la noción de entropía sea suficientemente justificada. "Sucede, apunta A. Lwoff, que el término *información* tiene, para el biólogo, otro sentido que para el físico (...). Un teorema de Einstein o el conjunto de letras al azar contienen la misma cantidad de información por poco que el número de letras sea el mismo. ¿Se debe aplicar esta constante a la información genética?" (35, p. 170). Medawar, por su parte, se lamenta de que se tenga tendencia a confundir orden en el sentido termodinámico, orden en el sentido biológico, improbabilidad y cantidad de información; inversamente, se tiende a establecer una "equivalencia abstracta" entre entropía, desorden, azar, probabilidad, etc. Estas asimilaciones audaces y frecuentemente sumarias, estima él, desembocan en fracasos. "Actualmente, debemos contentarnos con decir esto: los conceptos de entropía y de orden termodinámico son apropiados cuando tratamos de energética; los conceptos de la teoría de la información cuando estudiamos la transmisión y la modificación de los mensajes, y el concepto de probabilidad cuando nos ocupamos de fenómenos en los que juega el azar, por ejemplo, cuando predecimos el resultado de experiencias de cruzamientos. Teorizando demasiado abstractamente, tendemos a olvidar la importancia y la diversidad de las funciones de las macromoléculas biológicas (...). El buen cumplimiento de sus actividades depende de propiedades más complejas, más variadas y más particulares de lo que se puede decir en el lenguaje de la energía o de la teoría de la información" (37, 4 p. 66-67). Esta apreciación tiene por lo menos el interés de precisar el problema epistemológico. No excluye, por supuesto, la posibilidad de

teorizaciones más adecuadas. Estas reservas, repitámoslo, no llevan de ninguna manera a las utilizaciones *limitadas* que los bioquímicos hacen de la termodinámica; no pretenden más que algunas extrapolaciones apresuradas.

No se han encontrado nuevas leyes físicas

Las ideas "complementaristas" de Delbrück no han sido confirmadas. Propiamente hablando, no se han descubierto "nuevas leyes físicas". Y menos mal que Luria, uno de los pioneros del grupo del fago, ha sido más consciente de lo que podía aportar la bioquímica y ha orientado hacia ella a su discípulo James Watson. Justamente el descubrimiento de la doble hélice (1953), hecho por este último y Crick, es lo que ha abierto el período "dogmático". Según el testimonio de Kendrew, Delbrück permaneció escéptico ante la utilidad de la química, incluso después de esta fecha; se preguntaba si este ingenioso modelo tenía algo que ver con la biología. Cuando Meselson y Stahl mostraron que, conforme al modelo propuesto, la replicación del ADN es "semi-conservativa", Delbrück no se confesó inmediatamente vencido y propuso otras explicaciones.

Durante los años 50, Delbrück se apartó: el bacteriófago, según su propia expresión, estaba "en buenas manos". Parecía claro, por otra parte, que se encontrarían "otras leyes de la física" en este dominio. Se volvió al estudio del sistema nervioso y en particular de la percepción. Trabajó primero sobre la bacteria *Rhodospillum*, después sobre el champiñón *Phycomyces*. Siempre activo, creó otro pequeño grupo: el "Phycomyces Group"... (9, p. 7). Puede que en 1972 los resultados debidos a éste que se llamaba "el papá" parecieran relativamente poco fértiles; pero para el historiador de ciencias que no se contenta con dar la lista de las publicaciones pasadas, aparecía como un personaje muy notorio. No solamente creó y animó vigorosamente el grupo del fago sobre el plan social, con Luria y Hershey, sino que supo estimular el nacimiento de ideas nuevas y al mismo tiempo ser un crítico exigente. Le ocurría frecuentemente, después de una exposición, explicar a su autor que nunca había oído nada tan malo... Cualquiera que fuese el valor intrínseco de sus ideas filosóficas, concuerdan los testimonios sobre el valor de las normas de trabajo que impuso: "Cuando se trataba de construir y de someter a una prueba un modelo conceptual, rechazaba apasionadamente todo lo que era

vago; así contribuyó a cambiar radicalmente toda la concepción de la investigación biológica" (Th. Puck, 9, 275).

Cuando un cambio de paradigma se está preparando, es útil (y quizás necesario) que los iniciadores de este tipo intervengan. Naturalmente, estas interpretaciones no deben ser emitidas más que con prudencia. Se debe señalar, por ejemplo, que ni Luria, ni Hershey, ni Watson, ni Benzer reconocen haber estado realmente influidos por las especulaciones sobre la "complementariedad". Hershey lo ha explicado así: "Aunque nunca me haya gustado el doble discurso de la complementariedad, pienso que he reconocido conscientemente una cierta diferencia cualitativa entre los investigadores del grupo del fago y los objetivos, por ejemplo, de los químicos estructuralistas y los bioquímicos en general" (citado en 45).

¿Existen dos biología molecular?

Las reflexiones precedentes desembocan en otro problema esencial: ¿qué es, finalmente, la biología molecular? . Y más exactamente, ¿hay una o dos biología molecular? Como ha señalado Kendrew, "los biólogos moleculares mismos no son de ninguna manera unánimes sobre la naturaleza de su tema a tratar". Demasiado a menudo, se admite implícita o explícitamente "que la biología molecular no ha nacido más que con el grupo del fago y que su tema central es la información biológica" (425). Pero este punto de vista puede ser legítimamente discutido. Bernal, por ejemplo, sugiere que la biología molecular se remonta a los trabajos de Astbury, que desde comienzos del año 1930 ha estudiado atentamente la estructura de los ácidos nucleicos [3, vol. 3, p. 904].

He aquí la definición dada por Astbury: la biología molecular "se ocupa particularmente de las formas de las moléculas biológicas, así como de la evolución (...) y de la diversificación de estas formas cuando se pasa a niveles de organización cada vez más elevados. La biología molecular es ante todo tridimensional y estructural, —lo que no significa, sin embargo, que constituya sólo un refinamiento de la morfología. Al mismo tiempo debe estudiar la génesis y la función" [citado en 26, p. 5]. La idea de *información* no es siquiera mencionada, sólo lo es la de *función*. La expresión de biología molecular, de la que Astbury fue uno de los primerísimos propagandistas, se extendió durante el año 1950. Una de las razones de este éxito es sin duda proporcionada por Crick: "Me veía forzado a presentarme como si fuera biólogo molecular (...) porque estaba

cansado de explicar que era a la vez un cristalógrafo, un bioquímico, un biofísico y un genetista" (citado en 45). Pero esta denominación cómoda engloba también la *genética molecular*, lo que corre el riesgo de ocultar una distinción importante.

Kendrew subraya en efecto que los genetistas, aunque interesados por la doble hélice del ADN, se preocupan "más bien por el aspecto topológico que por el aspecto geométrico" de su estructura. Lo que les importa "es la naturaleza unidimensional (más que tridimensional) del abastecimiento de la información y el papel de los pares específicos de bases nitrogenadas en la replicación". De donde deduce que existían (y que existen) dos escuelas de biólogos moleculares: "los estructuralistas y las informacionalistas, los tridimensionalistas y los unidimensionalistas" [29]. Entre las dos categorías de investigadores, aunque se escuchan educadamente, la comunicación, según Kendrew, no es tan perfecta como pudiera creerse. La tendencia estructuralista puede ser considerada como una rama de la bioquímica; es el caso de la escuela inglesa descendiente de W.H. Bragg y de W.L. Bragg, a la que se unen Astbury, Bernal, Perutz y Kendrew mismo. Es en Cambridge donde los dos últimos, haciendo biología molecular en el sentido estricto definido por Astbury, han llevado a cabo sus hermosos trabajos sobre la mioglobina y la hemoglobina. En California, otro estructuralista, Linus Pauling, había descubierto la α hélice en 1951.

Una cuestión delicada: las relaciones de la física y la biología

Desde un punto de vista epistemológico, Stent apunta que la influencia de la biología molecular estructural no tuvo efectos revolucionarios. De ninguna manera pone en cuestión el valor de los resultados obtenidos, esto es evidente, pero insiste sobre la actitud filosófica de los estructuralistas: eran unos investigadores que tenían una "visión ramplona de las relaciones entre la física y la biología". No ponían en tela de juicio la idea de que los fenómenos biológicos más complejos estaban sometidos a las leyes clásicas de la física. Se interesaban muy poco por la genética. Su esfuerzo se dirigía a determinar la configuración espacial de las moléculas biológicas, y en particular de las proteínas; pero no se preocupaban apenas del estudio de su *función*, que reservaban para el futuro.

La tendencia informacionalista, por el contrario, ha elegido estudiar la genética apoyándose en concepciones mucho menos convencionales, en particular admitiendo que la biología podía enriquecer la física. Se

reconocen en ella temas apreciados por Delbrück. Una vez más conviene no endurecer la oposición indicada por Stent: la existencia de estas dos corrientes "filosóficas" no implica que haya una barrera rígida y continua justo en medio de la biología molecular. Pero a menos que se tenga una concepción muy estricta de la historia de las ciencias, es bastante esclarecedor tener en cuenta este segundo plano.

Si se admite que hay en la historia del pensamiento científico dos grandes tradiciones, una representada, por ejemplo, por Galileo, Newton y Lavoisier, la otra por Diderot, Lamarck y Goethe, es tentador unir a Delbrück a esta última. Pues Diderot, Lamarck y Goethe, oponiéndose a los mecanicistas y a los atomistas, estimaban que "la misma química debía estar fundada sobre principios fisiológicos" [58, p. 361]; desconfiaban de todo biólogo reduccionista, de todo lo que consideraban como exceso de análisis. Se encuentra en ellos "la necesidad de valorizar lo que vive" [19, p. 45]. Aún hoy, es posible discernir en los biólogos tal o cual eco de estos antiguos conflictos, incluso sin ser evocados en el trabajo científico propiamente dicho. Léanse, por ejemplo, estas tres obras: *Atomes et Organisme* de W.M. Elsasser, *Les problèmes de la vie* de Ludwig von Bertalanffy y *Le hasard et la nécessité* de Jacques Monod [19, 5, 43]. Como en el pasado, sucede que los resultados obtenidos no han confirmado las filosofías de tipo vitalista (o más bien vitalistas)¹¹. Pero como en el pasado también, los que han intentado estas filosofías han jugado un papel nada despreciable formulando nuevas preguntas y luchando por preservar la especificidad de la biología [27, p. 45, 106, 264,... y 12, p. 83 sq].

El artículo de Avery (1944): ¿neumococos o genética?

Hemos visto que para evocar el pasado de la biología molecular, algunos parten del fago, otros de Astbury. H.V. Wyatt parte del famoso artículo de Avery, MacLeod y McCarty aparecido en 1944 [66]. Esta manera de proceder es comprensible si se tienen en cuenta las preocupaciones de Wyatt: lo que le interesa es la manera en la que la información científica es presentada, difundida, asimilada o ignorada... Después de una

11. En revancha, la biología molecular ha confirmado las concepciones francamente mecanicistas de Jacques Loeb, que desde 1911 deseaba que se estudiara la "sustancia química" de los cromosomas y los mecanismos que permiten la transmisión de los caracteres hereditarios. (Ver W, p. 153).

encuesta llevada a cabo en el período 1944-1953, se ve llevado, por ejemplo, a concluir que *los artículos clave son citados raramente de manera directa*. Hay en ello, a primera vista, una paradoja sobre la que uno puede interrogarse.

¿Qué había mostrado Avery? "Este hecho capital: que las propiedades hereditarias del neumococo pueden ser alteradas específicamente por la adición de ADN de peso molecular elevado preparado cuidadosamente". Pero esta manera de resumir el artículo, que se debe a Watson (62, p. 66), es en un sentido inexacta, aunque haya sido muy difundida. Después, es cómodo y posible decir que "las propiedades hereditarias del neumococo" son alteradas por el ADN viral. Pero de hecho, el artículo de Avery no mencionaba en ninguna parte la idea de herencia. Retrospectivamente, el resumen de Watson deja creer que la significación del trabajo de Avery para los genéticos era evidente. Ahora bien, lo cierto es lo contrario: durante largo tiempo y en numerosos medios científicos, el artículo aparecido en el *Journal of Experimental Medicine* no tuvo influencia o ésta fue muy limitada. Los genetistas de la época no pensaban que el ADN tuviera una relación estrecha con los fenómenos de la herencia. Como dijo Stent esbozando una comparación con Mendel, los nuevos resultados no entraban en los cuadros establecidos del pensamiento científico (citado en 18). El concepto central que utilizaba Avery era el de la *transformación*: "Estudios sobre la naturaleza química de la sustancia inducían a la transformación de tipos de neumococos". El artículo estaba destinado a los especialistas en neumococos y no a los especialistas en genética.

Hay que señalar que esta situación se refleja en los *abstracts* que aparecen entonces. El lector que no hubiera consultado las tablas no habría encontrado ninguna referencia al artículo de Avery ni bajo "gen", ni bajo "híbrido", ni bajo "mutación", ni bajo "genotipo", etc. Pero Wyatt indica con toda la razón que no se sabría estar resentido contra los editores y redactores, pues McCarty mismo, es decir, uno de los autores, redactó un *abstract* que no contenía ninguna alusión a la genética. Lo que siempre se mide con las debilidades del sistema de *abstracts* y de índices.

No basta con que los resultados científicos se impriman para que su significado se perciba

Este ejemplo muestra lo que el simple enunciado de los resultados experimentales tiene de insuficiente. Cada vez que sea posible, es preferible, conforme al deseo de Delbrück, sugerir también las interpreta-

ciones teóricas que parezcan probables. Estas interpretaciones habrían servido de "trampolín" a los lectores susceptibles de estar interesados. Ahora se sabe que este deseo habría podido ser satisfecho fácilmente, pues Avery había visto el interés eventual de su trabajo para la genética. En 1943, es decir, justamente antes de la aparición de su artículo, había escrito una carta a su hermano, que no deja ninguna duda: el ADN "se presenta aparentemente como un virus, pero puede ser un gen". Todo sucede como si a Avery le hubiera faltado audacia: no ha expresado esta idea en su artículo. El carácter del investigador ha podido entrar en juego. Según Coburn, uno de sus amigos, Avery era muy modesto y temía dejar imprimir teorías todavía inseguras.

Luria ha declarado que había sido consciente de la importancia de este trabajo desde antes de su publicación. Pero el grupo del fago, sin embargo, apenas lo ha tenido en cuenta. En lo que concierne a Luria, Wyatt propone una explicación: "Una de las razones (de esta falta de interés) era que Luria había propuesto una teoría que exigía un material genético conteniendo poco ADN". Poco a poco, la importancia del ADN fue reconocida. Pero hay que descartar la idea de un progreso lineal y armonioso, de una acumulación lógica de "descubrimientos". El examen de los documentos (por ejemplo, los informes de los simposiums de Cold Spring Harbor) revela que las relaciones de los bioquímicos, microbiólogos y de los genetistas fueron muy variables. Chargaff, que era bioquímico, se orienta enseguida hacia el estudio de los ácidos nucleicos y obtiene resultados capitales sobre las proporciones de los cuatro nucleótidos en el ADN. Pero los genetistas no vieron inmediatamente el provecho que podían sacar de las experiencias de "transformación".

Sobre este punto, los *textbooks* resultan instructivos. En la *General Genetics* de Srb y Owen, aparecida en 1952, el nombre de Avery no se cita, y no llega a una página lo que se dedica a las experiencias sobre los neumococos. En los *Advances in Genetics*, publicados anualmente desde 1947, hay que esperar hasta 1955 para ver aparecer el nombre de Avery; los índices de los ocho primeros volúmenes (hasta 1956 incluido) no señalan las palabras ADN ni ARN (aunque aparecen en los textos). Estos ejemplos y otros muchos confirman que, incluso en el siglo xx, se necesita tiempo no sólo para poner a punto un "paradigma", sino también para asegurar su difusión. Pero sería inexacto pensar que todas las resistencias que encuentran las nuevas ideas emanan de espíritus estrechos, mal informados o reaccionarios. En 1972, el "dogma central" era considerado como perfectamente demostrado. Pero por una parte no se sabe lo que será

la biología de mañana; nada prueba que el dogma de hoy esté al abrigo de toda modificación o reinterpretación en un cuadro nuevo. Por otra parte y más prosaicamente, hay que reconocer que no había falta de razón, al principio, para atribuir un papel a las proteínas en la transmisión de información genética¹²; en diversas experiencias, por ejemplo, se reconocía que cierto porcentaje de proteínas acompañaban al ADN. Desde un punto de vista crítico, era normal esperar las confirmaciones suplementarias. Es demasiado fácil reconstruir después del acontecimiento una historia ideal con "buenos" y "malos". La vida real de la ciencia es más dialéctica: hacen falta espíritus imaginativos y aventureros para hacer avanzar, pero también espíritus críticos y prudentes para prevenir las divagaciones y luchas contra los dogmatismos prematuros. El segundo papel es menos glorioso que el primero, pero, sin embargo, fundamental.

Utilidad de las revistas de divulgación

Nuestra última observación tratará sobre el papel de las revistas de divulgación. En el momento mismo en el que la experiencia clave de Avery era desconocida por una gran parte de científicos a los que concernía, ésta era expuesta ampliamente en algunas revistas de divulgación. Wyatt cita, por ejemplo, dos artículos de la *American Scientist*, publicados en 1945 y 1948, en los que se acentuaba el carácter fundamental de los trabajos de Avery¹³. Según él, los artículos de alta divulgación ("literatura semi-popular") son susceptibles de ejercer más influencia sobre los estudiantes y los jóvenes investigadores que las revistas especializadas y los "textbooks". Esto se debería a la forma demasiado rígida de las comunicaciones científicas originales, donde las reflexiones no se pueden desarrollar más que sometiéndolas a normas extremadamente estrictas. Estas normas son necesarias, en el sentido de que corresponden a las exigencias críticas del trabajo científico. Pero, sobre todo en los períodos en los que maduran las ideas nuevas, pueden tener, en efecto, inhibición: parece que sea solamente fuera de las publicaciones científicas normales y en las discusiones, ya públicas, ya privadas, en donde una concepción nueva y atrevida pueda ser el objeto de un debate".

Concluamos sumariamente. Los desarrollos precedentes muestran hasta qué punto ha sido un fenómeno complejo la formación de la biología

12. Avery, en el artículo de 1944, vislumbraba expresamente esta posibilidad: no afirmaba categóricamente que la propiedad descrita dependía del ADN.

13. Estos dos artículos se debían respectivamente a Hutchinson y a Beadle.

molecular. Aún no se ha escrito una historia "definitiva" de ella, y puede que sea imposible escribir tal historia, pues incluso disponiendo de documentos numerosos y seguros, la evaluación de la importancia de los "hechos" permanece muy en el aire. Depende del punto de vista elegido (¿historia de los resultados o historia de la vida de la ciencia?) y de la época en la que escribe el historiador. ¿Cómo contarán la biología de hoy los historiadores del año 2000? Es absurdo pensar que discernan estudiando el período actual, gracias a la visión retrospectiva, tendencias y líneas de fuerza que se nos escapan o que subestimamos. De cualquier manera, los estudios que hemos citado tienen un interés mayor: sugieren una visión global de la actividad científica. No presentan una retrospectiva completa, pero muestran lo que podría ser la historia a la que hacemos alusión: a la vez historia del discurso científico propiamente dicho e historia de los cuadros y de los cambios sociales que permiten el trabajo científico. A lo que hay que añadir una historia de los segundos términos filosóficos e ideológicos, inseparables de los dos precedentes; es la más difícil de escribir, pero sin ella uno se arriesga a no tomar un aspecto esencial de la dinámica general. Convendría por último situar la actividad científica en contextos sociales más vastos aún. La emigración de numerosos investigadores europeos¹⁴ a partir del año 1930, por ejemplo, está directamente ligada a una situación política (21). Se pueden formular dos observaciones análogas a propósitos del malestar que reinaba entre los físicos después de la Segunda Guerra Mundial y que pudo contribuir a empujar a algunos de ellos a la biología (10, p.3).

Una síntesis histórica de este género no sabría conseguir un panorama sencillo. Piénsese, por ejemplo, en la complejidad del papel de Delbrück, a la vez sembrador de ideas que han sido mal confirmadas (o no confirmadas) y animador de un grupo cuyo éxito científico es innegable. Pero lo que se pierde en simplicidad es ampliamente compensado por una mejor comprensión de lo que se llama a veces simplistamente "progreso científico". Se siente uno tentado a parafrasear una fórmula célebre: si la ciencia escribe derecho, es sobre renglones torcidos.

La Recherche, mayo 1972.

14. El caso de Delbrück y de Luria ya ha sido mencionado. Citemos también el de Schrödinger: había dejado la Alemania nazi y vivía en Irlanda cuando escribió *What is Life?* El físico Leo Szilard, que jugó un cierto papel en el grupo del fago, era de origen húngaro y había emigrado a Estados Unidos en 1937.

2. LAS FRONTERAS DE LA BIOLOGIA

Jacques Monod

Cuando se piensa en el inmenso cambio recorrido por la evolución quizás desde hace tres millares de años, en la prodigiosa riqueza de las estructuras que ha creado, en la milagrosa eficacia de las cualidades de los seres vivos, desde la "bacteria" hasta el "hombre", cabe dudar que todo esto pueda ser el producto de una enorme lotería, tirando al azar números entre los que una selección ciega ha designado extraños ganadores.

Al volver a examinar con detalle las pruebas acumuladas hoy de que esta concepción es la única compatible con los hechos (principalmente con los mecanismos moleculares de la replicación, de la mutación y de la traducción) se encuentra la certeza, pero no se encuentra la comprensión inmediata, sintética e intuitiva de la evolución en su conjunto. El milagro se "explica": nos parece todavía milagroso. Como escribe Mauriac: "Lo que dice este profesor es bastante más increíble de lo que nosotros creemos, nosotros pobres cristianos".

Las fronteras actuales del conocimiento biológico

Es verdad, como es verdad que uno no llega a hacerse una imagen mental satisfactoria de ciertas abstracciones de la física moderna. Pero sabemos también que tales dificultades no pueden ser tomadas como argumento contra una teoría que tiene para ella la certeza de la experiencia y de la lógica. Para la física, microscópica o cosmológica, vemos la causa de la incompreensión intuitiva: la escala de fenómenos vislumbrados trasciende las categorías de nuestra experiencia inmediata. Sólo la abstracción puede suplir esta imperfección sin hierirla. Para la biología la dificultad es de otro orden. Las interacciones elementales sobre las que reposa todo son de aprehensión relativamente fácil gracias a su carácter mecanístico. Es la formidable complejidad de los sistemas vivos que desafía toda representa-

ción intuitiva global. En biología como en física, no hay, en estas dificultades subjetivas, argumento contra la teoría.

Se puede decir hoy que los mecanismos elementales de la evolución son no sólo comprendidos en principio, sino identificados con precisión. La solución encontrada es tanto más satisfactoria cuanto que se trata de los mecanismos mismos que aseguran la estabilidad de las especies: invariación replicativa del ADN, coherencia teleonómica de los organismos.

La evolución aún sigue siendo en biología la noción central destinada a enriquecer y a precisarse todavía durante largo tiempo. Para lo esencial, sin embargo, el problema está resuelto y la evolución no figura ya en las fronteras del conocimiento.

Estas fronteras yo las veo, por mi parte, en las dos extremidades de la evolución: el origen de los primeros sistemas vivos por una parte, y por otra parte el funcionamiento del sistema más intensamente teleonómico que haya jamás emergido: el sistema nervioso central del hombre. En el presente capítulo, quisiera intentar eliminar estas dos fronteras de lo desconocido.

El problema de los orígenes

Se podría pensar que el descubrimiento de los mecanismos universales sobre los cuales reposan las propiedades esenciales de los seres vivos ha esclarecido la solución del problema de los orígenes. De hecho estos descubrimientos, al traer de nuevo casi enteramente la cuestión, planteada hoy en términos mucho más precisos, la han revelado más difícil aún de lo que parecía antes.

Se pueden *a priori* definir tres etapas en el proceso que ha podido conducir a la aparición de los primeros organismos:

a) la formación sobre la Tierra de los constituyentes químicos esenciales de los seres vivos, nucleótidos y aminoácidos;

b) la formación, a partir de estos materiales, de las primeras macromoléculas capaces de replicación;

c) la evolución que, alrededor de estas "estructuras replicativas", ha construido un aparato teleonómico para llegar a la célula primitiva.

Los problemas que plantea la interpretación de cada una de estas etapas son diferentes.

La primera, frecuentemente llamada "prebiótica", es ampliamente accesible, no sólo en la teoría, sino por la experiencia. Si persiste la

incertidumbre, y persistirá sin duda, sobre las vías que de hecho ha seguido la evolución química prebiótica, el cuadro de conjunto aparece bastante claro. Las condiciones de la atmósfera y de la corteza terrestre, hace cuatro mil millones de años, eran favorables a la acumulación de ciertos compuestos simples del carbono tales como el metano. Había también agua y amoníaco. Ahora bien, de estos compuestos simples y en presencia de catalizadores no biológicos, se obtienen bastante fácilmente numerosos cuerpos muy complejos, entre los que figuran aminoácidos y los precursores de los nucleótidos (bases nitrogenadas, azúcares). El hecho notable es que, en ciertas condiciones, en las que la reunión parece muy plausible, el rendimiento de esta síntesis en cuerpos idénticos o análogos a los constituyentes de la célula moderna es muy elevado.

Se puede considerar entonces como *probado* que, en un momento dado sobre la Tierra, ciertas extensiones de agua *podían* contener en solución concentraciones elevadas de constituyentes esenciales de dos clases de macromoléculas biológicas, ácidos nucleicos y proteínas. En esta "sopa prebiótica", diversas macromoléculas *podían* formarse por polimerización de sus precursores, aminoácidos y nucleótidos. Se ha obtenido, en efecto, en el laboratorio, en condiciones "plausibles", polipéptidos y polinucleótidos parecidos por su estructura general a las macromoléculas "modernas".

Hasta aquí, por consiguiente, no hay dificultades mayores. Pero la primera etapa decisiva no se ha franqueado: la formación de macromoléculas capaces, en las condiciones de la sopa primitiva, de promover su propia replicación, sin la ayuda de ningún aparato teleológico. Esta dificultad no parece insalvable. Se ha demostrado que una secuencia polinucleotídica puede efectivamente guiar, por apareamiento espontáneo, la formación de elementos de secuencia complementaria. Por supuesto, tal mecanismo no podía ser más que muy ineficaz y sujeto a innumerables errores. Pero, desde el momento en que entraba en juego, los tres procesos fundamentales de evolución: replicación, mutación, selección, habían empezado a operar y debían dar una ventaja considerable a las macromoléculas más aptas por su estructura secuencial, a replicarse espontáneamente¹.

La tercera etapa es, por hipótesis, la emergencia gradual de los sistemas teleonómicos que, alrededor de la estructura replicativa, debía construir un *organismo*, una célula primitiva. Así es como se alcanza la verdadera "barrera del sonido", pues no tenemos ninguna idea de lo que podía ser la estructura de una célula primitiva. El sistema más sencillo que conocíamos, la célula bacteriana, pequeña maquinaria de complejidad y

1. L. Orgel, *J. Mol. Biol.*; 38, 381-393 (1968).

eficacia extremas, quizás había alcanzado su estado de perfección actual hace más de mil millones de años. El plan de conjunto de la química de esta célula es el mismo que el de todos los demás seres vivos. Emplea el mismo código genético y la misma mecánica de traducción que las células humanas, por ejemplo.

Así, las células más sencillas que se nos hayan dado para estudiar no tienen nada de "primitivo". Son el producto de una selección que ha podido, a través de quinientos o mil millones de generaciones, acumular un aparejo teleonómico tan potente que los vestigios de las estructuras verdaderamente primitivas son indiscernibles. Reconstruir sin fósiles tal evolución es imposible. Todavía se querría poder al menos sugerir una hipótesis plausible en cuanto a la vía seguida por esta evolución, sobre todo en su punto de partida.

El enigma del origen del código

El desarrollo del sistema metabólico, que ha debido, a medida que se empobrecía la sopa primitiva, "aprender" a movilizar el potencial químico y a sintetizar los constituyentes celulares, plantea problemas hercúlicos. Lo mismo sucede con la emergencia de la membrana con permeabilidad selectiva sin la que no puede haber célula viable. Pero el problema mayor es el origen del código genético y del mecanismo de su traducción. De hecho, no es de "problema" de lo que habría que hablar, sino más bien de un verdadero enigma.

El código no tiene sentido a menos que sea traducido. La máquina de traducir de la célula moderna consta por lo menos de cincuenta constituyentes macromoleculares *que son ellos mismos códigos en el ADN: el código no puede ser traducido nada más que por productos de traducción*. Es la expresión moderna de *omne vivum ex ovo*. ¿Cómo y cuándo se ha cerrado sobre sí misma esta anilla? Es excesivamente difícil de imaginar. Pero el hecho de que el código sea hoy descifrado y conocido para ser universal permite al menos plantear el problema en términos precisos; simplificando un poco bajo la forma de la siguiente alternativa:

a) la estructura del código se explica por las razones químicas o más exactamente estereoquímicas; si ha sido "elegido" tal codón para representar tal aminoácido, es porque entre ellos existía cierta afinidad estereoquímica;

b) la estructura del código es químicamente arbitraria; el código, tal como nosotros lo conocemos, resulta de una serie de elecciones al azar que lo han enriquecido poco a poco.

La primera hipótesis parece de lejos la más seductora. Primero, porque explicaría la universalidad del código. Después, porque permitiría imaginar un mecanismo primitivo de traducción en el que el alineamiento secuencial de los aminoácidos para formar un polipéptido se debería a una interacción directa entre los aminoácidos y la estructura replicativa misma. Finalmente, y sobre todo, porque esta hipótesis, si fuera verdad, sería en principio verificable. También han sido hechas numerosas tentativas de verificación, cuyo balance debe ser considerado, por el momento, como negativo².

Puede ser que la última palabra sobre este tema no haya sido dicha. Esperando una confirmación que parece improbable, uno es llevado a la segunda hipótesis, desagradable por razones metodológicas, lo que no significa, de ninguna manera, que sea inexacta. Desagradable por varias razones. No explica la universalidad del código. Hay que admitir entonces que entre numerosas tentativas de elaboración, sólo una ha sobrevivido. Lo que, desde luego, es en sí muy probable, pero no propone ningún modelo de traducción primitivo. Entonces deben entrar en juego las especulaciones; no faltan algunas ingeniosas: el campo está libre, demasiado libre.

El enigma permanece, oculta también la respuesta a una pregunta de profundo interés. La vida apareció sobre la Tierra; ¿cuál era *antes del acontecimiento* la probabilidad de que fuera así? La estructura actual de la biosfera no excluye la hipótesis (al contrario) de que el acontecimiento decisivo no se haya producido *más que una sola vez*. Lo que significaría que su probabilidad *a priori* era casi nula.

Esta idea repugna a la mayor parte de los hombres de ciencia. De un acontecimiento único la ciencia no puede decir ni hacer nada. No puede disertar más que sobre acontecimientos que formen una clase, y de la que la probabilidad *a priori*, si es reducida, es finita. Ahora bien, por la universalidad misma de sus estructuras, empezando por el código, la biosfera aparece como el producto de un acontecimiento único. Es posible, por supuesto, que este carácter singular se deba a la eliminación, por selección de muchas otras tentativas o variantes. Pero nada impone esta interpretación.

La probabilidad *a priori* de que se produzca un acontecimiento particular entre todos los acontecimientos posibles en el universo es

2. Cf. F. Crick, *J. Mol. Biol.*; 38, 367-379 (1968)

próxima a cero. Sin embargo el universo existe; realmente es necesario que se produzcan acontecimientos particulares, de los que la probabilidad (antes del acontecimiento) era ínfima. No tenemos derecho a afirmar, en el momento actual, ni a negar que la vida haya aparecido *una sola vez* sobre la Tierra, y que, por consiguiente, antes que ella no fuera, sus posibilidades de ser eran casi nulas.

Esta idea no es solamente desagradable a los biólogos en tanto que hombres de ciencia. Contraría nuestra tendencia humana a creer que toda cosa real en el universo actual era necesaria, y siempre es necesario estar en guardia contra este sentimiento tan poderoso del destino. La ciencia moderna ignora toda inmanencia. El destino se escribe a medida que se cumple, no antes. El nuestro no lo era antes de que emergiera la especie humana, sólo en la biosfera para utilizar un sistema lógico de comunicación simbólica. Otro acontecimiento único que debería, por esto mismo, prevenirnos contra todo antropocentrismo. Si fue único, como quizás lo fue la aparición de la vida misma, es que, antes de aparecer, sus posibilidades eran casi nulas. El Universo no era la parte importante de la vida, ni la biosfera del hombre. Nuestro número salió en el juego de Monte-Carlo. ¿Qué tiene de sorprendente en lo que experimentábamos lo extraño de nuestra condición, sejemante al que acaba de ganar mil millones?

La otra frontera: el sistema nervioso central

La lógica podría advertir al biólogo que sus esfuerzos para "comprender" el funcionamiento completo del cerebro humano están condenados al fracaso, puesto que ningún sistema lógico sabría describir integralmente su propia estructura. Esta advertencia estaría fuera de lugar; tan lejos se está todavía de esta frontera absoluta del conocimiento. De todas formas esta objeción lógica no se aplica en el análisis por el hombre del sistema nervioso central de un animal. Sistema que se puede suponer menos complejo y menos potente que el nuestro. Incluso en este caso, sin embargo, queda una dificultad mayor: la experiencia consciente de un animal nos es impenetrable y sin duda lo será siempre. ¿Se puede afirmar que la descripción exhaustiva del funcionamiento del cerebro de una rana, por ejemplo, sería posible, en principio, cuando esta base permaneciera inaccesible? Se permite la duda. De manera que la exploración del cerebro humano, a pesar de las barreras opuestas a la experimentación,

permanecerá siempre irremplazable, por la posibilidad que ofrece de comparar las bases objetivas y subjetivas relativas a una experiencia.

Sea como fuere, la estructura y la función del cerebro pueden y deben ser exploradas simultáneamente a todos los niveles accesibles con la esperanza de que estas investigaciones, muy diferentes por sus métodos como por su objeto inmediato, convergerán un día. Por el momento no convergen apenas más que por los problemas que todas ellas plantean.

Entre los más difíciles y más importantes, están los problemas que plantea el desarrollo epigenético de una estructura tan compleja como el sistema nervioso central. En el caso del hombre, comprende de 10^{12} a 10^{13} neuronas interconectadas por mediación de entre 10^{14} y 10^{15} sinapsis, de las que algunos asocian células nerviosas alejadas unas de otras. Ya he mencionado el enigma que propone la realización de interacciones morfogenéticas a distancia, y no volveré a tratarlo aquí. Al menos tales problemas pueden ser planteados claramente gracias, sobre todo, a ciertas experiencias notables³.

No se sabría comprender el funcionamiento del sistema nervioso central sin conocer el del elemento lógico primario que constituye la sinapsis. De todos los niveles de análisis es el más accesible a la experiencia y mediante técnicas refinadas se han logrado una cantidad considerable de documentos. Aún se está lejos, no obstante, de una interpretación de la transmisión sináptica en términos de interacciones moleculares. Problema esencial, sin embargo, puesto que es ahí sin duda donde reside el último secreto de la memoria. Desde hace tiempo se propuso que ésta estuviera registrada en forma de una alteración más o menos irreversible de las interacciones moleculares responsables de la transmisión de influjo nervioso a nivel de un conjunto de sinapsis. Esta teoría tiene para ella toda la verosimilitud, pero no pruebas directas⁴.

A pesar de esta profunda ignorancia concerniente a los mecanismos primarios del sistema nervioso central, la electrofisiología moderna ha facilitado sobre el análisis y la integración de las señales nerviosas, principalmente en ciertas vías sensoriales, resultados profundamente significativos.

3. Sperry.

4. Una teoría según la cual la memoria estaría cifrada en la secuencia de los radiales de ciertas macromoléculas (ácidos ribonucleicos) es creída por algunos fisiólogos. Estos creían aparentemente volver a unir así y utilizar las concepciones sacadas del estudio del código genético. Ahora bien, esta teoría es insostenible de cara a nuestros conocimientos actuales sobre el código y los mecanismos de la traducción.

Primero sobre las propiedades de la neurona como integradora de las señales que pueden recibir (por medio de sinapsis) de otras numerosas células. El análisis ha probado que la neurona es difícilmente comparable, por sus cualidades técnicas, a los componentes integrantes de una calculadora electrónica. Es capaz como éstas de efectuar, por ejemplo, todas las operaciones lógicas de álgebra proposicional. Pero además puede adicionar o sustraer diferentes signos teniendo en cuenta su coincidencia en el tiempo, así como modificar la *frecuencia* de los signos que emiten en función de la *amplitud* de los que ha recibido. De hecho, parece que algún componente unitario actual utilizado por las calculadoras modernas no sea capaz de cualidades técnicas tan variadas y finamente moduladas. Sin embargo, la analogía sigue siendo impresionante y la comparación entre las máquinas cibernéticas y el sistema nervioso central, fructífera. Pero hay que ver que se limita todavía a los niveles inferiores de integración: primeros grados de análisis sensorial, por ejemplo. Las funciones superiores del córtex, del cual el lenguaje es la expresión, parecen escapar aún totalmente. Uno puede preguntarse si no hay en ello más que una diferencia "cuantitativa" (grado de complejidad) o "cualitativa". En mi opinión esta cuestión no tiene sentido. Nada permite suponer que las interacciones elementales sean de naturaleza diferente a diferentes niveles de integración. Si existe un caso en el que la primera ley de la dialéctica es aplicable, sin duda es éste.

Funciones del sistema nervioso central

El refinamiento mismo de las funciones cognoscitivas en el hombre y la abundancia de aplicaciones que hace de ellas ocultan para nosotros las funciones primordiales que el cerebro desempeña en la serie animal (comprendido el hombre). Quizás se puedan enumerar y definir estas funciones primordiales de la manera siguiente:

1. Asegurar el órgano de transmisión y la coordinación central de la actividad neuromotriz en función, principalmente, de las aferencias sensoriales.
2. Contener, en forma de circuitos genéticamente determinados, programas de acción más o menos complejos; ponerlos en marcha en función de estímulos particulares.
3. Analizar, filtrar e integrar las aferencias sensoriales para re-cons-

truir una representación del mundo exterior a las cualidades específicas del animal.

4. Registrar los acontecimientos que (teniendo en cuenta la gama de cualidades específicas) son significativos, agruparlos en clases según sus analogías; asociar estas clases según las relaciones (de coincidencia o de sucesión) de los acontecimientos que las constituyen; enriquecer, refinar y diversificar los programas innatos incluyendo en ellos estas experiencias.

5. Imaginar, es decir *representar* y *simular* acontecimientos exteriores, o programas de acción del animal mismo.

Las funciones definidas por los tres primeros apartados son desempeñadas por el sistema nervioso central de los animales a los que no se califica generalmente de superiores: artrópodos, por ejemplo. Los ejemplos más espectaculares que se conocen de programas de acción innatos muy complejos se encuentran de nuevo en los insectos. Es dudoso que las funciones resumidas por el párrafo 4 juegue un papel importante en los animales⁵. En revanche, contribuyen de manera muy importante al comportamiento de los invertebrados superiores, p. ej. el pulpo⁶, así por supuesto como al de todos los vertebrados.

En cuanto a las funciones del párrafo 5, que cabría calificar de "proyectivas", sin duda son privilegio de los vertebrados superiores. Pero aquí la barrera de la conciencia se interpone, y puede que no supiéramos reconocer los signos exteriores de esta actividad (el sueño, por ejemplo) más que en el caso de nuestros parientes próximos, sin que otras especies carezcan de la misma.

Las funciones 4 y 5 son cognoscitivas, mientras que las de los párrafos 1, 2 y 3 son únicamente coordinadoras y representativas. Sólo las funciones 5 pueden ser creadoras de *experiencia subjetiva*.

El análisis de las impresiones sensoriales

Según la proposición del párrafo 3, el análisis por el sistema nervioso central de las impresiones sensoriales da una representación empobrecida y orientada del mundo exterior. Un tipo de resumen en el que no figura a plena luz más que lo que interesa particularmente al animal en función de

5. A excepción, quizás, de las abejas.

6. J.Z. Young, *A model of the brain*, Oxford University Press (1964).

su comportamiento específico (en suma es un resumen "crítico", tomando la palabra en una acepción completamente de sentido kantiano). La experiencia demuestra ampliamente que está bien así. Por ejemplo, el analizador situado detrás del ojo de una rana permite ver una mosca (es decir, un punto negro) en movimiento, pero no en reposo⁷; la rana no atraparé de un bocado más que la mosca en vuelo. Hay que insistir en el hecho, demostrado por el análisis electrofisiológico, de que no se trata de un comportamiento que haría desdeñar a la rana un punto negro inmóvil, como no representativo con certeza de un alimento. La imagen del punto inmóvil se imprime sin duda en la retina, pero no es transmitida. El sistema sólo resulta excitado por un objeto en movimiento.

Algunas experiencias sobre el gato⁸ sugieren una interpretación del misterioso hecho de que un campo reflejando a la vez todos los colores del espectro sea visto como una playa blanca, cuando el blanco es subjetivamente interpretado como ausencia de todo color. Los experimentadores han mostrado que, como resultado de inhibiciones cruzadas entre ciertas neuronas respondiendo respectivamente a las diversas longitudes de ondas, éstas no enviaban señales cuando la retina estaba expuesta uniformemente a la gama entera de longitudes de onda visible. Goethe tenía, pues, en un sentido subjetivo, razón frente a Newton. Error eminentemente perdonable a un poeta.

Que los animales sean capaces de clasificar los objetos o las relaciones entre los objetos según categorías arbitrarias, principalmente geométricas, no tiene tampoco duda: un pulpo o una rata puede aprender la noción de triángulo, de círculo o de cuadrado y reconocer sin falta estas figuras por sus propiedades geométricas, independiente de la dimensión, de la orientación o del color con el que se haya podido revestir el objeto real que se les presenta.

El estudio de circuitos que analizan las figuras presentadas en el campo de visión del gato demuestra que estas proezas geométricas se deben a la estructura misma de los circuitos que filtran y recomponen la imagen retiniana. Estos analizadores imponen, en definitiva, sus propias restricciones a la imagen de la que extraen ciertos elementos sencillos. Algunas células nerviosas, por ejemplo, no responden más que a una figura recta inclinada de izquierda a derecha; otras a una recta inclinada en sentido inverso. Las "nociones" de la geometría elemental no son, pues, tanto

7. H.B. Barlow, *J. Physiol.*, 119, 69-88 (1953).

8. T.N. Wiesel y D.H. Hubel, *J. Neurophysiol.*, 29, 1115-1156 (1966).

representadas en el objeto como por el analizador sensorial, que las percibe y recompone a partir de sus elementos más sencillos⁹.

Innatismo y empirismo

Estos descubrimientos modernos dan, pues, razón, en un sentido nuevo, a Descartes y a Kant, contra el empirismo radical que, sin embargo, no ha cesado apenas de reinar en la ciencia desde hace doscientos años, dejando el recelo sobre toda hipótesis suponiendo "innatos" los esquemas de conocimiento. Todavía en nuestros días hay algunos etólogos que parecen atados a la idea de que los elementos del comportamiento en el animal o bien son innatos o bien aprendidos, cada una de estas dos formas excluyendo absolutamente la otra. Esta concepción es absolutamente errónea, como Lorenz ha demostrado acaloradamente¹⁰. Cuando el comportamiento implica elementos adquiridos por la experiencia, lo son según un programa innato, es decir, genéticamente determinado. La estructura del programa llama y guía el aprendizaje que se inscribirá, pues da una determinada "forma" preestablecida, definida en el patrimonio genético de la especie. Sin duda es así como hay que interpretar el proceso de aprendizaje primario del lenguaje en el niño. No hay ninguna razón para suponer que no sea del mismo modo para las categorías fundamentales del conocimiento en el hombre y puede ser también para muchos otros elementos del comportamiento humano, menos fundamentales, pero de gran significación para el individuo y la sociedad. Tal tipo de problemas son en principio accesibles a la experiencia. Los etólogos manejan problemas parecidos todos los días. Experiencias crueles impensables de practicar sobre el hombre, sobre el niño exactamente. De manera que por respeto a sí mismo, el hombre no tiene más remedio que prohibirse explorar ciertas estructuras constitutivas de su ser.

La larga controversia sobre lo innato de las "ideas", negada por los empiristas, recuerda a la que ha dividido a los biólogos en cuanto al tema de la distinción entre fonotipo y genotipo. Distinción fundamental, indispensable a la definición misma del patrimonio para los genetistas que la habían introducido, pero muy sospechosa a los ojos de muchos biólogos no genetistas que no ven en ello más que un artificio destinado a salvar el

9. D.H. Hubel y T.N. Wiesel, *J. Physiol.*, 148, 574-591 (1959)

10. K. Lorenz, *Evolution and Modification of Behavior*, University of Chicago Press, Chicago (1965).

postulado de la invariación del gen. Encontramos en esto una vez más, la oposición entre los que sólo quieren conocer el objeto actual, concreto, en su presencia absoluta, y los que buscan discernir en ello la representación enmascarada de una forma ideal. Hay dos tipos de sabios, decía Alain: los que aman las ideas y los que las odian. Estas dos actitudes de espíritu se oponen todavía en la ciencia; la una y la otra son necesarias a sus progresos por la confrontación entre sí. Es lamentable para los despreciadores de ideas, que este progreso, al que contribuyen, les quite la razón invariablemente.

En un sentido muy importante, los grandes empiristas del siglo XVIII no estaban equivocados, sin embargo. Es realmente cierto que todo, en los seres vivos, viene de la experiencia (comprendido lo innato genético), aunque sea el comportamiento estereotipado de las abejas o los cuadros innatos del conocimiento humano. Pero no de la experiencia actual, renovada por cada individuo, en cada generación: de la acumulada por la ascendencia total de la especie al curso de la evolución. Sólo esta experiencia tomada al azar, sólo estas tentativas innumerables, pulidas por la selección, podían hacer del sistema nervioso central (como de cualquier otro órgano) un sistema adaptado a su función particular. Para el cerebro: dar del mundo sensible una representación adecuada a las cualidades de la especie, proporcionar el cuadro que permite clasificar eficazmente los datos, en sí mismos inutilizables, de la experiencia inmediata e incluso, en el hombre, simular subjetivamente la experiencia para anticipar los resultados y preparar la acción.

La función de simulación

Es el potente desarrollo y la utilización intensiva de la función de simulación lo que parece que caracteriza las propiedades únicas del cerebro del hombre. Esto al nivel más profundo de las funciones cognoscitivas, aquel sobre el que reposa el lenguaje y que sin duda sólo explica en parte. Esta función, sin embargo, no es exclusivamente humana. El perro de corta edad que manifiesta su alegría al ver que su dueño se prepara para el paseo evidentemente *imagina* (es decir, simula por anticipación) los descubrimientos que va a hacer, las aventuras que le esperan, los espantos deliciosos que experimentará, sin peligro, gracias a la tranquilizadora presencia de su protector. Más tarde, simulará todo esto de nuevo, confusamente, en sueños.

En el caso del animal, como también en el del niño, la simulación

objetiva no parece más que parcialmente disociada de la actividad neuromotriz. Su ejercicio se traduce por el juego. Pero en el hombre, la simulación subjetiva se convierte en la función superior por excelencia, la función creadora. Es ella la que resulta reflejada por el simbolismo del lenguaje, que la explicita transponiendo y resumiendo sus operaciones. De ahí el hecho, subrayado por Chomsky, de que el lenguaje, incluso en sus empleos más humildes, es casi siempre innovador: traduce una experiencia subjetiva, una simulación particular, siempre nueva. También en esto el lenguaje humano difiere radicalmente de la comunicación animal. Esta se reduce a llamadas o advertencias que corresponden a cierto número de situaciones concretas estereotipadas. El animal más inteligente, capaz sin duda de simulaciones subjetivas bastante exactas, no dispone de ningún medio para "liberar su conciencia", si no es indicando burdamente en que *sentido* juega su imaginación. El hombre sabe hablar sus experiencias subjetivas: la experiencia nueva, el encuentro creador, ya no perece con aquél por quien habrá sido simulada por primera vez.

Todos los científicos han debido, pienso yo, tomar conciencia de que su reflexión, a nivel profundo, no es verbal: es una *experiencia imaginaria* simulada con la ayuda de formas, fuerzas, interacciones que no componen más que apenas una "imagen" en el sentido visual del término. Me he sorprendido a mí mismo, no teniendo ninguna otra cosa en el campo de la conciencia a fuerza de atención centrada sobre la experiencia imaginaria, al identificarme con una molécula de proteína. Sin embargo no es en este momento en el que aparece la significación de la experiencia simulada, sino sólo una vez explicitada simbólicamente. Yo no creo que se esté a punto de considerar las imágenes no visuales, sobre las que opera la simulación como símbolo, sino más bien, si me atrevo a decirlo, como "la realidad" subjetiva y abstracta, directamente ofrecida a la experiencia imaginaria.

De cualquier forma, en el uso corriente, el proceso de simulación está enteramente enmascarado por la palabra que le sigue casi inmediatamente y parece confundirse con el pensamiento mismo. Pero se sabe que numerosas observaciones objetivas prueban que en el hombre las funciones cognitivas, incluso complejas, no son unidas inmediatamente a la palabra (o a cualquier otro medio de expresión simbólica). Se pueden citar especialmente estudios hechos sobre diversos tipos de afasia. Quizás las experiencias más impresionantes sean unas, recientes, de Sperry¹¹, sobre sujetos a los que los dos hemisferios cerebrales les habían sido separados

11. J. Levi-Agresti y R.W. Sperry, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 61, 1151 (1968).

por sección quirúrgica del *corpus callosum*. El ojo derecho y la mano derecha, en estos sujetos, no comunican información más que al hemisferio izquierdo, y recíprocamente. Así un objeto visto por el ojo izquierdo, o palpado por la mano izquierda, es reconocido, sin que el sujeto pueda nombrarlo. Ahora bien, en algunos tests difíciles en los que se trata de relacionar la forma tridimensional de un objeto que se tiene con una de las dos manos al desarrollo *en pleno* de esta forma, representada en una pantalla, el hemisferio derecho (afásico) se mostraba muy superior al hemisferio "dominante" (izquierdo) y más rápido en la discriminación. Es tentador especular sobre la posibilidad de que una parte importante, quizás la más "profunda" de la simulación subjetiva, sea asegurada por el hemisferio derecho.

Si es legítimo considerar que el pensamiento reposa sobre un proceso de simulación subjetiva, hay que admitir que el alto desarrollo de esta facultad en el hombre es el resultado de una evolución en el curso de la cual es en la acción concreta, preparada por la experiencia imaginaria, donde la eficacia de este proceso, su valor de supervivencia, ha sido probado por la selección. Es pues, por su capacidad de representación adecuada y de previsión exacta *confirmada por la experiencia concreta* por la que el poder de simulación del sistema nervioso central, en nuestros antepasados, ha sido empujado hasta el estado alcanzado en el *Homo sapiens*. El simulador subjetivo no podía equivocarse cuando se trataba de organizar una cacería de pantera con las armas de las que podía disponer el Australántropo, el Pitecántropo o incluso el *Homo sapiens* de Cromagnon. Por esto es por lo que el instrumento lógico innato, heredado de nuestros antepasados, no nos engaña y nos permite "comprender" los acontecimientos del universo, es decir, describirlos en lenguaje simbólico y preverlos, con tal que los elementos de información necesarios sean proporcionados al simulador.

Instrumento de anticipación enriqueciéndose sin cesar con los resultados de sus propias experiencias, el simulador es el instrumento del descubrimiento y de la creación. Es el análisis de la lógica de su funcionamiento subjetivo lo que ha permitido formular las reglas de la lógica objetiva y crear nuevos instrumentos simbólicos, tales como las matemáticas. Grandes espíritus (Einstein) se han maravillado a menudo, con razón, de que los seres matemáticos creados por el hombre puedan representar tan fielmente la naturaleza, cuando resulta que ellos no deben nada a la experiencia. Nada, es cierto, a la experiencia individual y concreta, pero todo a las virtudes del simulador forjado por la experiencia.

innombrable y cruel de nuestros humildes antepasados. Confrontando sistemáticamente la lógica y la experiencia según el método científico, es en efecto toda la experiencia de estos antepasados la que confrontamos nosotros con la experiencia actual.

La ilusión dualista y la presencia del espíritu

Si podemos adivinar la existencia de este maravilloso instrumento, si sabemos traducir, por el lenguaje, el resultado de sus operaciones, no tenemos ninguna idea de su funcionamiento, de su estructura. La experimentación fisiológica es, desde este punto de vista, casi impotente aún. La introspección, con todos sus peligros, nos ha dicho, a pesar de todo, un poco más. Queda el análisis del lenguaje que, sin embargo, no revela el proceso de simulación más que a través de transformaciones desconocidas y no explicita sin duda todas las operaciones.

He ahí la frontera, casi tan infranqueable todavía para nosotros como lo era para Descartes. En tanto que no sea franqueada, el dualismo conservará en suma su verdad operacional. La noción de cerebro y la de espíritu nos confunden más a nosotros en la vida actual que a los hombres del siglo XVII. El análisis objetivo nos obliga a ver una ilusión en el dualismo aparente del ser. Ilusión, no obstante, tan íntimamente atada al ser mismo que sería bastante vano esperar disiparla nunca en la aprehensión inmediata de la subjetividad, o aprender a vivir afectivamente, moralmente, sin ella. Y, por otra parte ¿por qué sería necesario? ¿Quién podría dudar de la presencia del espíritu? Reconocer a la ilusión que ve en el alma una "substancia" inmediata no es negar su existencia, sino al contrario empezar a reconocer la complejidad, la riqueza, la insondable profundidad de la herencia genética y cultural, como de la experiencia personal, consciente o no, que parece constituyente del ser que nosotros somos, único e irrecusable testimonio de sí mismo.



3. BIOLOGIA MOLECULAR: LA PROXIMA ETAPA

François Jacob



En el curso de los veinte últimos años, la biología ha conocido una transformación profunda por la convergencia de disciplinas mantenidas largo tiempo independientes tanto por los problemas que consideraban como por el material y la metodología que utilizaban. Tanto es así que la fisiología celular, la genética, la bioquímica, la virología, la microbiología, se han fundido en una disciplina común, que hoy se está de acuerdo en designar bajo el nombre de biología molecular. Esta tiende a interpretar los fenómenos que se desarrollan en el seno de los organismos vivos en función de las estructuras y de las interrelaciones funcionales que se manifiestan entre los constituyentes macromoleculares de la célula.

En su primera etapa, la biología molecular se ha comprometido a analizar el material celular más sencillo, a saber, la célula bacteriana, que algunos descubrimientos habían convertido en accesible para tal estudio. En algunos años, la elucidación de la estructura de las principales macromoléculas biológicas, proteínas y ácidos nucleicos, la interpretación de sus funciones en términos de estructura, el reconocimiento de sus vías de biosíntesis y de sus regulaciones han renovado nuestro conocimiento de la herencia y de los mecanismos celulares.

Un trabajo considerable queda por llevar a cabo sobre la célula bacteriana, pues numerosos problemas que pueden ser abordados en este material relativamente sencillo quedan aún sin solución. Si nos sentimos razonablemente seguros de nuestra capacidad para saber determinar la secuencia primaria de diversas proteínas, comprendemos mal las leyes que determinan sus estructuras terciaria o cuaternaria, así como las proteínas que les permiten reconocer otras proteínas, asociarse, reconocer pequeñas moléculas, catalizar sus transformaciones químicas, etc. Es importante analizar con detalle los mecanismos que conducen a la integración de los circuitos reguladores de la célula, la estructura de membranas y el mecanismo de su crecimiento, los procesos de la división celular, la formación de esporas, etc.

De la bacteria al mamífero: 1.000 veces más información genética

También parece que el tiempo ha venido a extender a organismos más complejos los métodos y los modos de pensamiento que la biología molecular ha inaugurado con el estudio de organismos celulares. No hay que ocultarse, sin embargo, que, incluso con los organismos multicelulares más sencillos, los problemas llegan a ser extraordinariamente más complejos que en las bacterias. Hoy se puede decir que se "comprende" la célula a grandes rasgos, pero no el tejido, el órgano o el organismo complejo. El crecimiento, el desarrollo, la reproducción y el comportamiento de un organismo exigen no sólo reacciones químicas muy variadas, sino una estricta coordinación de estas actividades químicas. No cabe duda de que el estudio de los organismos multicelulares debe ante todo consistir en el análisis de sus mecanismos reguladores. Pero a pesar de la importancia de estos mecanismos que contribuyen en gran parte a los fenómenos estudiados por fisiólogos, embriólogos, endocrinólogos y neurobiólogos, se conocen todavía extremadamente mal los principios puestos en juego. En resumidas cuentas, estos sistemas reguladores deben actuar al nivel de la célula. Pero hasta el transcurso de los últimos años no ha sido puesta en evidencia, en la célula bacteriana, una red de circuitos reguladores. Y si estas redes bacterianas pueden servir de modelos como punto de partida en el análisis de los organismos superiores, parece poco dudoso que éstos posean sistemas reguladores que no existen en las bacterias, y es por tres razones diferentes.

En los organismos multicelulares, la expresión de los diferentes genes debe ser dispuesta de manera que el desarrollo del organismo resulte ordenado con rigor. Existe, pues, necesariamente una secuencia exacta de acontecimientos bioquímicos en el transcurso de los cuales la expresión misma de los genes se modifica a medida que las células se diferencian. Se necesitan sistemas capaces de inducir, o inhibir, de manera permanente la actividad de segmentos genéticos. Además, la enorme complejidad del material genético con relación al de la célula bacteriana exige necesariamente un mecanismo más elaborado para asegurar la elección de los genes destinados a ser activados. El ADN de una célula bacteriana puede determinar la estructura de unas 2.000 a 3.000 cadenas peptídicas; contiene unos cientos de operones cuya actividad puede ser desencadenada o inhibida de manera instantánea y reversible. Las células de un mamífero contienen alrededor de 1.000 veces más de ADN que una *Escherichia coli*.

El problema de activar, o inhibir, cierto gen entre un millón (en lugar de mil) no puede ser resuelto por métodos tan sencillos. Los organismos superiores necesitan una lógica nueva para que se seleccionen, en el tiempo y en el espacio, los segmentos de información genética que se descifran. Y uno de los métodos más sencillos consiste en efectuar una selección en etapas, mediante una serie de regulaciones sucesivas que pueden realizarse a niveles diferentes: en el núcleo, al nivel del ADN mismo, o después de la transcripción; en el citoplasma, para determinar la estabilidad de los mensajeros, la formación o la actividad de los polisomas, etc.

Por otra parte, los problemas de regulación que se plantean por el estudio de organismos complejos y diferenciados no sólo tienen un orden de complejidad muy superior a los que existen en las bacterias; son también de naturaleza diferente. Lo que primero exige la célula bacteriana es mantener su homeostasis intercelular cuando se adapta a medios diversos. Las células del tejido tienen que hacer frente a una situación completamente diferente. Si la célula de un órgano dado debe igualmente mantener un estado homeostático definido, necesita también coordinar sus actividades con las de otras células del órgano. Solamente así el órgano mismo puede plegarse a sus funciones, que a su vez están sometidas al reglamento del organismo en su totalidad.

Finalmente, en los organismos complejos resulta necesario que signos o mensajes puedan ser transmitidos de célula en célula. Esto resulta de una serie de fenómenos que se observan en las células de organismos superiores. Estos fenómenos no tienen, por supuesto, ninguna contrapartida en los organismos microcelulares que, al contrario, parecen cuidadosamente protegidos contra tales efectos.

Resumiendo, los organismos aparecen hoy como el producto de la ejecución de un programa genético que se desenvuelve en el tiempo y en el espacio. Lo que importa es comprender el lenguaje del sistema lógico que determina la emergencia de las líneas celulares diferenciadas y sus interacciones.

El por qué del desarrollo y de la diferenciación

Numerosos problemas que se pueden plantear en el estudio de los organismos superiores se han renovado con la adquisición de los conocimientos recientes sobre el papel del material genético, sobre las

relaciones que se establecen entre ácidos nucleicos y proteínas, sobre la importancia de la conformación de las proteínas y de su variación. Se hace posible plantear ciertas cuestiones concretas en la medida en la que se desarrollan las técnicas necesarias.

Hay que incrementar una genética del desarrollo y de la diferenciación, por una parte en el organismo entero, por otra en los cultivos de células somáticas tomadas de los organismos complejos. La simplicidad del análisis genético, en las bacterias, ha permitido reconocer la red reguladora de la célula bacteriana y precisar sus elementos. Este tipo de investigación considera al organismo, o a la célula, como una "caja negra" en la que intenta desorganizar, por mutación, los engranajes desconocidos a fin de analizar efectos e identificar constituyentes. Es uno de los métodos más potentes para demostrar la existencia de componentes raros, presentes en muy pequeña cantidad, y para estudiar sus funciones. No ha sido aún aplicada sistemáticamente a problemas tan complejos como el crecimiento de un miembro y la diferenciación de sus partes, o la articulación de las neuronas entre sí y con el aparato sensorial, por ejemplo. De hecho, lo que probablemente sea necesario es poder yuxtaponer el análisis genético del organismo entero y el análisis genético de las células somáticas.

Incluso en ausencia del análisis genético, el estudio fisiológico y bioquímico debe ser desarrollado. Pero cabe esperar que las proteínas con papel clave en las interacciones reguladoras estén presentes con mucha frecuencia en muy escasa cantidad en las células. Además, las pruebas de su actividad *in vitro*, necesarias para su aislamiento y purificación, constituyen evidentemente una tarea mucho más delicada que con un enzima. El estudio bioquímico de estos sistemas reguladores puede ser llevado a cabo cuando es posible añadir de fuera al sistema —organismo entero, tejido o cultivos de células— un factor conocido para ejercer un efecto regulador. Es el caso de las hormonas morfogenéticas como la tiroxina o los estrógenos tal como la ecdisona de los insectos, todos conocidos para modificar, en límites muy amplios, la química de las células que les sirven de lugar de acción.

Repensar la noción de investigación interdisciplinaria

Genética y bioquímica no son más que dos ejemplos de disciplinas que evidentemente hay que desarrollar para abordar el estudio de los organismos superiores, y se podrían citar otros muchos. De hecho, tales

investigaciones están en vías de desarrollo en los institutos de investigación más diversos. Pero lo más frecuente es que sean obra de equipos un poco aislados que trabajan sobre problemas embriológicos, o neurológicos, o psicológicos, o bioquímicos, o genéticos, etc. Lo que importa, y el desarrollo reciente de la biología molecular lo ha demostrado, es la colaboración que debe establecerse entre equipos dedicados a actividades muy diversas. Es necesario que bioquímicos y genetistas, neurólogos y embriólogos se codeen sin cesar, en el seno de un mismo instituto, para atacar los mismos problemas bajo ángulos diversos. Esto es frecuentemente difícil de realizar cuando, a la diferencia de las formaciones, de los intereses, de los métodos, se añade también la diferencia de material. Si en biología molecular les ha resultado relativamente fácil a investigadores de origen diferente unir sus esfuerzos en un trabajo convergente, es porque el material de estudio era a menudo común: la célula de *Escherichia coli* y sus bacteriófagos. Entonces los problemas, sin ser exactamente los mismos para cada uno, se complementaban; el trabajo de uno llegaba a ser necesario a otro; la técnica puesta a punto por éste era inmediatamente tomada y utilizada por aquél.

En cierta medida una situación algo similar se presenta para el acceso a los organismos superiores. En un mismo instituto, los biólogos tienen su material, los embriólogos otro, los neurofisiólogos un tercero, etc. Y en cada caso, esta elección está justificada por el trabajo de un equipo que se preocupa poco de lo que hacen los vecinos. ¡Pero cuántos esfuerzos ahorrados si los inmunólogos tuvieran en la mano los antígenos de los que, al lado, los bioquímicos estudian las propiedades, o los anticuerpos que los genetistas y embriólogos necesitan sin cesar! Cuánto más eficaz sería un conjunto en donde los genetistas produjeran los organismos mutantes que necesitan el químico, el fisiólogo, el neurólogo o el embriólogo. Es inútil seguir esta enumeración; el interés de tener equipos muy diversos para trabajar sobre un organismo común es evidente. Esto no significa, desde luego, que deba ser siempre así. El trabajo que llevan a cabo numerosos investigadores frecuentemente queda aislado, tanto a causa del temperamento de los investigadores mismos como por la naturaleza del problema estudiado. Esto forma parte de la investigación y debe naturalmente continuar. Pero es importante subrayar que una *fracción* del esfuerzo científico y financiero que se consagrará al desarrollo de la biología en el curso de los próximos años debería centrarse en el estudio del material biológico común. Ciertos institutos se han especializado en *técnicas*: es excepcional que, científicamente, tentativas de este tipo no se traduzcan

en un fracaso total, por la nulidad de los resultados. Por el contrario, los institutos que han sido dirigidos a estudios de *problemas* han conocido frecuentemente el éxito y se han desarrollado en consecuencia. Hoy la evolución de la investigación en biología conduce a centrar una *pequeña fracción* de esfuerzo, en el porvenir, en el estudio de un *organismo*.

Por un instituto del ratón

Si se admite la idea de institutos centrados en el estudio de un organismo, la pregunta que naturalmente surge es: ¿qué organismo? En la situación actual, es una pregunta muy delicada. La bacteria presenta una célula; un nematodo o un rotífero, 10^3 ; una mosca del orden de 10^7 ó 10^8 , un ratón joven más de 10^{10} , es decir, cerca de infinito. Entre el infinito de células que forman el mamífero, incluso pequeño, y la bacteria, hay seguramente lugar para un organismo de complejidad reducida. Pero la dificultad consiste en elegir, porque, si los organismos medios presentan ventajas evidentes, tienen también inconvenientes que limitan su utilización. Algunos nematodos, por ejemplo, por la rapidez de su crecimiento, la ventaja de su sistema de reproducción y la facilidad que hay para cultivarlos, permiten un estudio genético de empuje. Pero su talla y su estructura prohíben toda intervención externa. Por el momento no hay posibilidad de cultivar sus células. En una palabra, el desarrollo embrionario es (y corre el riesgo de quedarse) totalmente inaccesible a la experimentación. La *Drosophila* presenta ventajas genéticas evidentes; si el cultivo de la célula es aún difícil, la implantación de discos imaginarios según la técnica de Haddorn da la posibilidad de un compromiso. Además, si las relaciones entre hormona por una parte, crecimiento y diferenciación por otra, están bien estudiadas en los insectos, éstos permiten difícilmente el acceso molecular de las hormonas o el estudio de relaciones intercelulares y del sistema nervioso. Los anfibios presentan las ventajas inversas: se prestan particularmente bien al estudio del desarrollo embrionario o del sistema nervioso, pero se prestan mal al análisis genético. Abreviando, la mayor parte de estos organismos constituyen material de elección para el análisis de tal o cual problema. Se puede estar seguro de que jugarán papeles crecientes en el desarrollo de la biología. No obstante, no parecen actualmente prestarse a un análisis convergente por parte de las disciplinas más variadas.

El único organismo que parece cubrir la mayor parte de condiciones

para tal estudio actualmente es el ratón. A pesar de su complejidad, el ratón es ya objeto de un número considerable de trabajos en las disciplinas más variadas y es inútil recordarlos aquí todos. Lo que hay que recordar, sin embargo, es que el tiempo de generación del ratón es relativamente corto, que la genética del ratón es actualmente una de las mejores, que las células del ratón se prestan particularmente bien al cultivo y que, aparte de los estudios endocrinológicos, fisiológicos e inmunológicos llevados a cabo sobre el ratón, sobre él se realizan numerosos análisis de patología, de virología y de cancerología. El principal inconveniente reside en la dificultad que hay de intervenir, después de las primeras divisiones del huevo, sobre un embrión que se desarrolla en el útero. Pero el desarrollo del embrión de mamífero constituye en sí mismo un problema de primera importancia, para el que cabe esperar una evolución rápida.

No hay que ocultarse que se trata de una empresa muy compleja. No puede realizarse ni de golpe ni por un solo hombre. La estructura que se diera a este instituto debe ser cuidadosamente elaborada, y los equipos que trabajarían en él, rigurosamente seleccionados, de verdad entusiasmados con este propósito. Más que nombrar un director virtual es importante designar un comité en el que los miembros, elegidos en cada una de las disciplinas implicadas, deberán estudiar tanto el problema de los hombres como el de las estructuras. Este instituto no debería probablemente ser construido, equipado y completado de golpe. Su edificación y, por consecuencia, su financiación deberían escalonarse en el tiempo.

Atomes, diciembre 1969.

4. LA BIOLOGIA MOLECULAR Y EL PORVENIR DE LA MEDICINA

Edward L. Tatum

¿Cuál será la influencia probable de la biología molecular (en el seno de la cual la estructura y el papel de los ácidos nucleicos tienen un lugar privilegiado) sobre el porvenir de la medicina? No siendo ni quiromántico ni médico, sin lugar a dudas avanzo vacilante las predicciones que vienen a continuación. Voy a mencionar en primer lugar los principales campos médicos en los que la biología molecular está directamente implicada. Me ocuparé entonces de prever un cierto número de desarrollos susceptibles de intervenir en el transcurso de los 10 a los 20 próximos años. Por último, después de haber analizado la situación en estos diversos campos, intentaré precisar lo que necesitaremos descubrir para que mis predicciones puedan realizarse.

Antes de enumerar los campos de la medicina más íntimamente ligados a la biología molecular, debo mencionar un problema que, aunque parezca muy lejano al tema que me ocupa, reviste para el hombre una importancia primordial: se trata del problema mundial de la población y los medios para alcanzar y mantener un equilibrio entre la explosión demográfica y las fuentes naturales. A menos que se resuelva y que sepamos evitar una nueva edad sombría, el progreso científico será cada vez más difícil de mantener, y la aplicación al hombre de los nuevos descubrimientos se hará imposible. Consideremos sin embargo este problema como soluble y volvamos a los dominios médicos. Consideremos primero aquellos en los que el progreso me parece depender directamente de la biología molecular y de las investigaciones sobre los ácidos nucleicos. Se trata: 1.º de los virus y de las enfermedades virales; 2.º de los desórdenes metabólicos hereditarios debidos a los trastornos enzimáticos o a anomalías de la regulación; 3.º de malformaciones adquiridas, congénitas y estructurales; 4.º del cáncer.

Los próximos veinte años

El estudio de los virus bacterianos, vegetales y animales, conservará seguramente el lugar preponderante que ocupa desde hace una decena de años. La mayoría de las enfermedades virales, si no todas, serán vencidas, ya sea gracias a la inmunología, ya sea gracias a la puesta a punto y a la síntesis de sustancias antivirales específicas. Se puede pensar, además, que los virus servirán al hombre no sólo en el estudio teórico de la genética de las células somáticas, sino igualmente en terapéutica de la herencia.

En el dominio de los desórdenes metabólicos, se puede esperar a que se esclarezca el origen genético de un número creciente de anomalías. Las aberraciones enzimáticas responsables de numerosas enfermedades serán identificadas, como ya ha ocurrido con la fenilcetonuria¹, la galactosemia, ciertas aminoacidurias, así como con las anomalías de la hemoglobina y otras proteínas séricas. El desarrollo de métodos rápidos, sencillos y sensibles para detectar los portadores de tales taras y establecer un diagnóstico precoz rápidamente de los individuos enfermos permitirá poner en práctica medidas eugenésicas más eficaces así como tratamientos igualmente más activos con la ayuda, principalmente, de regímenes apropiados. Podemos incluso permitirnos cierto optimismo soñando con las infinitas posibilidades terapéuticas ofrecidas por la puesta a punto, la síntesis y la introducción de nuevos genes (ADN), o de los productos resultantes de estos genes, en las células defectuosas de órganos dados.

En lo que concierne a la ontogénesis², una mejor comprensión de las secuencias moleculares y de las secuencias espacio-temporales participantes en la diferenciación y el desarrollo permite proyectar la prevención y la atenuación de errores ontogénicos como las malformaciones congénitas, ya sean debidas a anomalías genéticas, a un error en la expresión o la regulación de un gen, o incluso ligadas indirectamente a la actividad de este gen mediante una secreción hormonal o la receptividad de un órgano dado.

Entre todos los dominios considerados, aquel en el que el porvenir (estrechamente ligado a la rápida acumulación de datos fundamentales previsible en biología molecular) resulta más prometedor es probablemente el del cáncer. Pienso que podemos razonablemente esperar evidenciar las causas fundamentales si no de todas, al menos de numerosas formas de cáncer, en el transcurso de algunas decenas de años futuros.

1. Ver "Un retraso mental evitable", *Atomes* núm. 230, p. 128.

2. La ontogénesis engloba el desarrollo de un organismo desde la concepción al estado adulto.

Todas las causas consideradas, virus, mutaciones o defectos de regulación, se centran en la genética celular, la estructura y el papel de los ácidos nucleicos. Esto nos permite igualmente predecir una verdadera terapéutica preventiva y curativa, epidemiológica, inmunológica y quimioterápica, ya sea por modificación y regulación de la actividad de los genes, ya sea por reparación o reemplazamiento de estos genes.



Figura 1. La doble hélice del ADN

Recordemos que la unidad estructural de los ácidos nucleicos es el nucleótido, constituido por una base (púrica o pirimídica), por un azúcar de cinco átomos de carbono (pentosa) [ribosa para los ácidos ribonucleicos (ARN) y desoxirribosa para los ácidos desoxirribonucleicos (ADN)] y, además, por una molécula de ácido fosfórico. Estos nucleótidos están unidos entre sí por un enlace éster entre una de las funciones alcohol del azúcar y una de las funciones al ácido fosfórico. Las bases púricas son la adenina y la guanina, tanto en el ADN como en el ARN. Las bases pirimídicas son la citosina y el uracilo en el ARN, la citosina y la timina en el ADN. La nomenclatura correspondiente es la siguiente:

Base	Base + azúcar = nucleósido	Base + azúcar + ácido fosfórico = nucleótido
citosina = C	citidina	ácido citidílico = CMP
uracilo = U	uridina	ácido uridílico = UMP
timina = T	timidina	ácido timidílico = TMP
guanina = G	guanosina	ácido guanílico = GMP
adenina = A	adenosina	ácido adenílico = AMP

Mi optimismo reposa en primer lugar sobre el valor general de los conceptos de la biología molecular. Se basa por otra parte en el estado actual de la investigación sobre los ácidos nucleicos, sobre el crecimiento exponencial de los conocimientos en este dominio particular y, más generalmente, en biología.

Estructura y replicación de los ácidos nucleicos

Ya es universalmente admitido que la unidad básica de la herencia en todas las formas de vida es el ADN, o ácido desoxirribonucleico, con sus dos cadenas helicoidales complementarias. Esta estructura bicatenaria, propuesta por Watson y Crick, ahora es familiar a todos³. Sólo ella posee todas las características esenciales de la actividad genética: especificidad gracias a la secuencia de las bases púricas y pirimídicas; mutación por modificación de esta secuencia; duplicación por ensambladura enzimática de nuevas cadenas sobre las dos cadenas parentales que sirven de modelos, y traducción en términos de funcionamiento celular por la transcripción de una cadena complementaria de ác. ribonucleico mensajero (m-ARN). El m-ARN es transportado del núcleo al citoplasma, donde dirige la ensambladura de los aminoácidos en enzimas y otras proteínas en los ribosomas, con la ayuda de sus secuencias de tres nucleótidos (tripletes) impuestos por el gen, que asegura así la ensambladura de secuencias de aminoácidos determinados en la proteína final.

El material genético se encuentra frecuentemente —quizás siempre— en forma de moléculas cíclicas, como sucede en los cromosomas bacterianos, en los bacteriófagos, en el virus del polioma e incluso en los cromosomas de las especies más evolucionadas. Esta forma circular tendrá un papel importante en el proceso de duplicación, que comienza —al menos en las bacterias— en un *locus* preciso y se propaga poco a poco a lo largo del cromosoma hasta que el proceso se termina. Puede que esta forma circular sirva, entre otras cosas, para proteger el ADN contra un ataque enzimático por las extremidades libres de la molécula.

Los hechos hacen pensar que la doble hélice de ácidos nucleicos es indispensable para su duplicación. Se ha demostrado, por ejemplo, que la replicación de un fago no llevando nada más que una cadena de ADN

3. En la estructura bicatenaria del ADN (ver fig. 2) se vuelven a encontrar siempre cara a cara en las cadenas complementarias, adenina-citosina y timina-guanina, lo que asegura una replicación fiel. En el ARN, el uracilo reemplaza a la timidina.



Figura 2. Representación esquemática de la replicación del ADN (según H. Firket).

(§ X174), la de la cadena única del ARN del fago f2 así como la de numerosos virus vegetales y animales implican la síntesis enzimática con una forma de duplicación a base de dos cadenas. Sólo una de estas dos macromoléculas (la cadena-), complemento de la cadena inicial, serviría de modelo para la síntesis del nuevo ARN viral (cadena+). No obstante, Spiegelman y sus colaboradores han indicado recientemente la existencia de una excepción: se trata de la replicación *in vitro* de un virus bacteriano con ARN biológicamente activo, que no requiere la formación transitoria de una segunda cadena⁴. Quizás la forma de duplicación bicatenaria estaba presente en tan débil cantidad que no ha podido ser detectada.

La presencia de dos cadenas también parece importante en los procesos de repartición de un ADN dañado por las radiaciones ultravioleta, por ejemplo. Recordemos que la acción de los rayos UV provoca la dimerización de los residuos de timina fortuitamente vecinos. La molécula de ADN, cuyo funcionamiento resulta inhibido así, es reactivada bajo el efecto de la luz blanca, que escinde el dímero y provoca simultáneamente la escisión de las moléculas de timina. En la obscuridad, estas últimas vuelven a su sitio en la molécula de ADN, que así se ha restablecido. Por una parte se conocen las bacterias mutantes incapaces de la reacción de escisión: se sabe, por otra parte, que la forma replicativa bicatenaria del fX174 puede restablecerse en la obscuridad, mientras que la cadena sencilla del mismo bacteriófago no puede. Añadamos que la exonucleasa III⁵, probablemente implicada en la reacción de escisión, estaría ausente en las bacterias mutantes incapaces de escindirse.

La estructura bicatenaria circular parece igualmente importante en la

4. Ver "Síntesis del ARN *in vitro*", *Atomes* núm. 227, p. 365, y núm. 238, p. 717.

5. Enzima específica de la hidrólisis del ADN, en ciertos puntos muy precisos.

elección del modelo ADN y ARN que presidirá la síntesis de un ARN dado. *In vitro*, la ARN polimerasa circular puede utilizar indiferentemente ADN o ARN como modelo, tengan estas moléculas una o dos cadenas. En general, en el ADN bicatenario, las dos cadenas sirven igualmente de modelo. Sin embargo, *in vivo* la síntesis de m-ARN y de ARN viral no utilizan más que una. Igual ocurre *in vitro*, en el momento de la síntesis de ARN a partir de ácidos nucleicos bicatenarios de bacteriófagos. Una serie de experiencias de Hayashi y Spiegelman sobre la forma replicativa de ADN de ϕ X174 hablan en favor del papel determinante de la forma circular en la transcripción a partir de una sola cadena. *In vitro*, es reproducida una sola cadena de la forma circular, mientras que cuando la molécula es lineal se transcriben las dos moléculas.



Figura 3. Micrografía electrónica del ADN extraída del virus del polio, preparada según la técnica de Kleinschmidt y Zahn. La forma circular de las moléculas es particularmente visible. El aspecto helicoidal de algunas de estas macromoléculas se debe a azares de la preparación. No podría confundirse en absoluto con la estructura en doble hélice que se sitúa en el seno mismo de cada filamento. Aumento: 52.000. (Cliché, Instituto Suizo de Investigaciones Experimentales sobre el Cáncer y Centro de Microscopía Electrónica, Lausanne).

Un importante campo de investigación concerniente a la estructura del ADN y su transcripción se abrió hace algunos años con el descubrimiento de Fleisch y sus colaboradores: la actinomicina D se enlaza específicamente con el grupo aminado de la guanina en el pequeño espacio que separa las dos cadenas del ADN. Se opone así al funcionamiento del

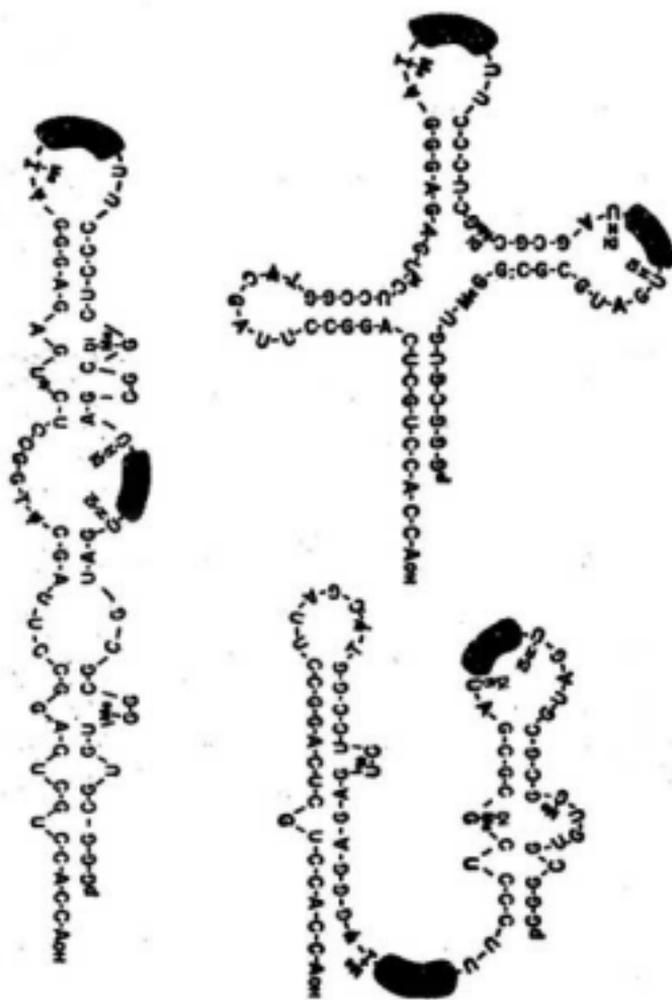


Figura 4. El conocimiento del encadenamiento de los nucleótidos del α -ARN de la valina permite considerar para este aminoácido tres configuraciones que constan de cortas zonas bicatenarias. Uno u otro de los dos tripletes sombreados en cada caso es responsable de la especificidad α -ARN valina. La representación de los α -ARN en la figura 5 es esquemática. (Según McElheny, *Science*.)

ADN como modelo para la síntesis de ARN, mientras que no interviene en la síntesis de ARN viral regida por ARN. Otros estudios han hecho evidente una reacción del mismo tipo por parte de la cromomicina y antibióticos derivados, y han demostrado que el bromuro de etidium y la daunomicina inhiben el funcionamiento del ADN de manera no específica (quizás como la proflavina), intercalándose entre los pares de bases vecinas. En investigaciones del mismo tipo, Bhuyan y Smith han demostrado que la nogalomicina se fija al ADN, probablemente ya sea a los residuos de adenina, ya sea a los residuos de timina. Por el contrario, otro antibiótico, la tubercidina, análoga a la adenosina, está incorporada lo mismo al ARN que al ADN, a la manera de otros análogos. Este tipo de estudios permite, generalmente, no sólo comprender la base molecular del funcionamiento de los antibióticos, sino además descubrir instrumentos favorables a una mejor comprensión de la estructura y de la forma de acción de los ácidos nucleicos.

Código genético y biosíntesis de las proteínas

La segunda etapa de la transcripción de un gen implica no sólo el m-ARN, sino también dos tipos de ARN cuyas estructuras vienen también determinadas genéticamente. El ARN de transferencia, todavía llamado ARN soluble (s-ARN), enlaza los aminoácidos activados mediante su extremidad terminada por los nucleótidos de las bases citosina-citosina-adenina, y los transfiere a la cadena polipeptídica en curso de síntesis en los ribosomas. Estos últimos contienen al menos dos estructuras ribosómicas a base de ARN (r-ARN) de masas moleculares diferentes. A cada aminoácido corresponde por lo menos un s-ARN específico de su transferencia. Parece que los *loci* del ADN responsables de la síntesis del ARN ribosómico y del ARN de transferencia estén enlazados y transcritos más o menos en grupo, mientras que los *loci* relativos al m-ARN, presentes en mayor número, están repartidos de forma menos precisa.

Cada molécula de s-ARN tiene dos puntos activos separados, el uno específico de su aminoácido y el otro correspondiente al triplete de bases o codón del m-ARN. En 1965, Holley y sus colaboradores establecieron por primera vez la secuencia completa de bases de uno de estos ARN: el s-ARN específico de la transferencia de la alanina, extraído de la levadura de cerveza. La estructura de otras moléculas de s-ARN se averiguará en un próximo futuro, lo que permitirá probablemente definir la estructura de

los dos emplazamientos activos: anticodón y emplazamiento específico del aminoácido.

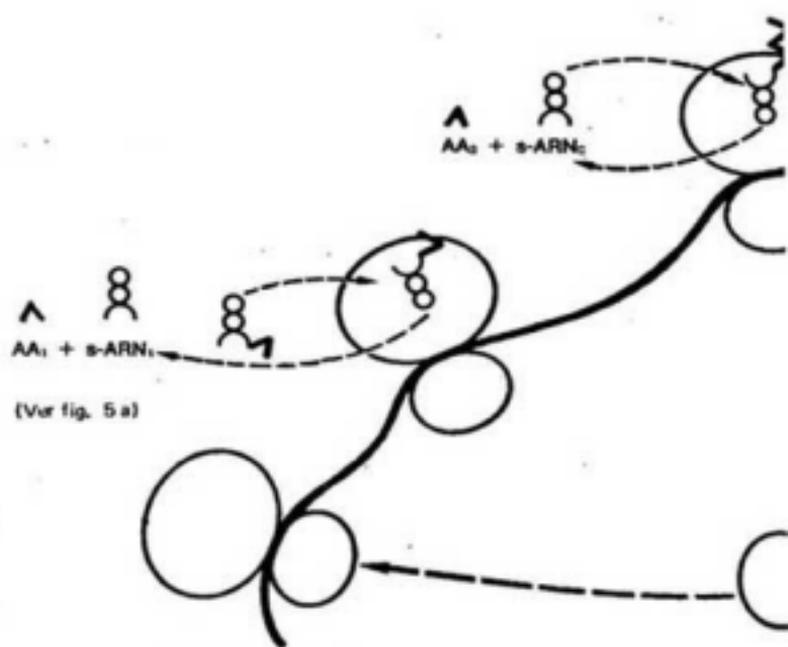
Los enlaces entre las cadenas polipeptídicas, etapa final de la biosíntesis proteica, tiene lugar en los ribosomas, constituidos por dos tipos de subunidades de tamaño diferente. Los ribosomas funcionan bajo forma de agregados o polisomas, en los que cada ribosoma es responsable de la transcripción de una de las diferentes regiones de la molécula de m-ARN que mantiene el agregado ribosómico. En ciertos casos, una sola molécula policistrónica⁶ de m-ARN puede codificar la síntesis de varias cadenas polipeptídicas.

La biosíntesis de proteínas sobre los ribosomas está reglamentada y controlada de numerosas maneras. La forma de actuar del alfabeto genético se ha planteado recientemente. ¿Existen señales de salida y llegada de la síntesis? Parece ser que sí. La señal que inicia la síntesis de la mayoría de las proteínas de *E. coli* parece ser una secuencia nucleotídica particular, específica de la N-formilmetionina y quizás incluso de la N-formilmetionil-alanil-serina. Terminada la síntesis, uno o varios residuos N terminales son eliminados por hidrólisis enzimática. Este proceso se ha hecho evidente gracias a los trabajos de Webster, Engelhardt y Zinder sobre la síntesis *in vitro* del revestimiento proteico del virus f2, así como por los estudios comparativos de Adams y Capecchi.

La existencia de signos de llegada parece igualmente plausible. Funcionarían de forma análoga a la puomicina que, fijándose en la extremidad carboxilica por la que la cadena polipeptídica crece, impide la adición de otros aminoácidos y provoca a partir del ribosoma la liberación de una cadena proteica incompleta. Según Brenner y sus colaboradores, los dos tripletes nucleotídicos UAG y UAA, que parecen no corresponder a ningún aminoácido, constituyen dos signos posibles susceptibles de significar el fin de una cadena peptídica en ciertas cepas de *E. coli*.

In vitro, la síntesis de las proteínas ribosómicas puede también ser modificada por las condiciones experimentales o las sustancias que se ligan a los ribosomas, disocian sus subunidades o afectan bien a su estructura, bien a su unión con el s-ARN. Citemos, por ejemplo, compuestos básicos como la espermidina, el antibiótico lincomicina y probablemente el cloranfenicol. Es interesante advertir que los disolventes orgánicos como el alcohol y ciertas sales pueden cambiar la especificidad entre el codón del m-ARN y el anticodón del s-ARN. A este nivel de ideas, se ha descubierto que las mutaciones que afectan a los genes supresores pueden implicar

6. Cistron: ver "La hemotipología humana", *Atomez*, núm. 235, p. 458.



(Ver fig. 5 a)

m-ARN que mantiene los ribosomas en agregado funcional,

ribosoma
formando
cadena

Figura 5. Representación esquemática de la formación de una cadena polipeptídica.

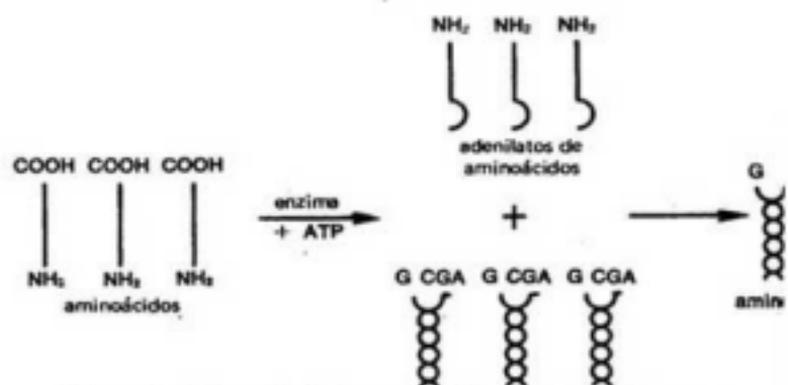


Figura 5a. Colocación de los aminoácidos sobre los ribosomas.

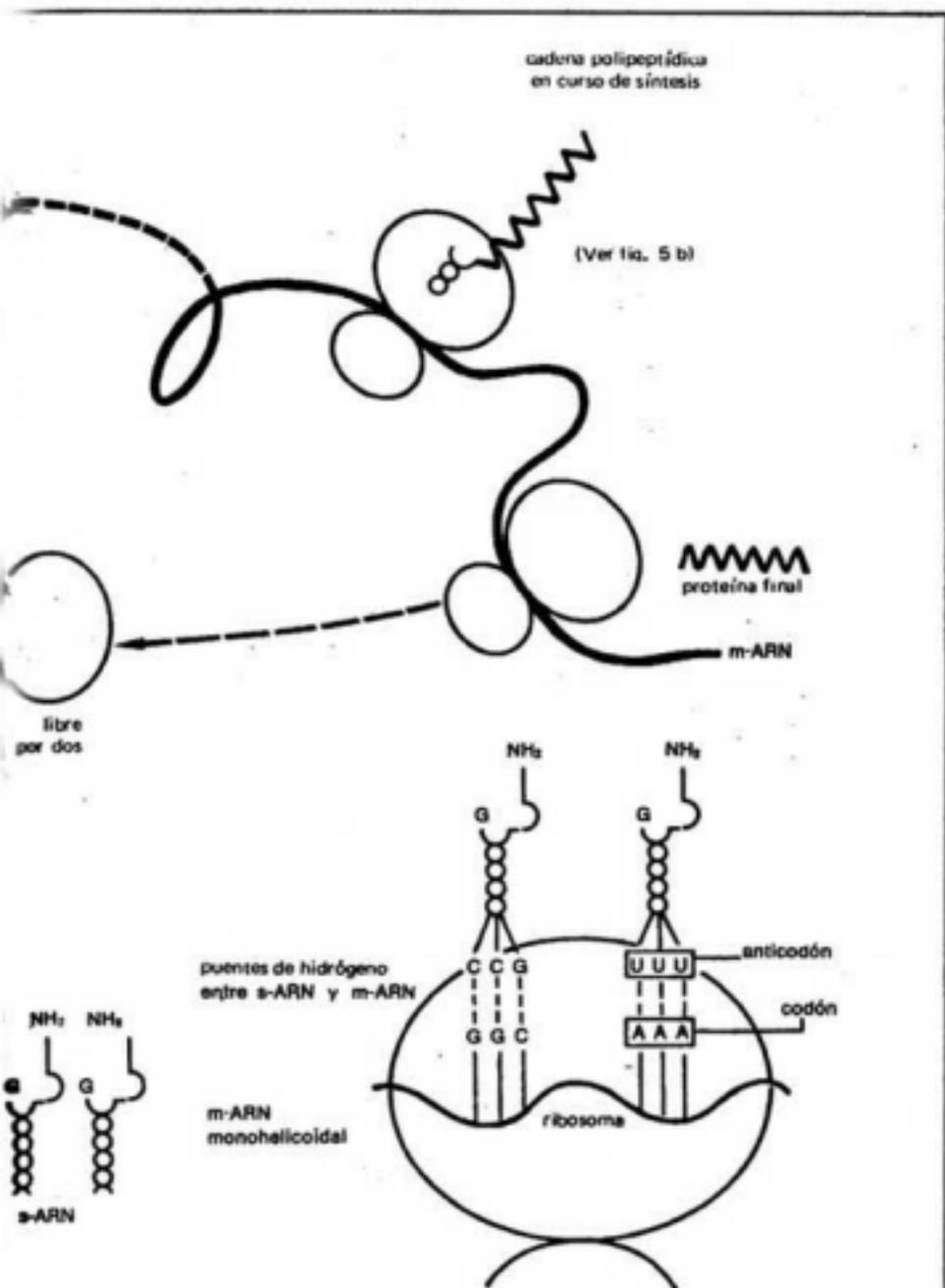


Figura 5b. Activación y transporte de los aminoácidos.

modificaciones del emplazamiento específico de un s-ARN dado, restituyendo así una transcripción normal. En este campo, Gorini y cols. han descubierto que la estreptomycin, que altera la especificidad del codón del m-ARN por el s-ARN correspondiente, haciendo imposible la transcripción normal, puede funcionar como una sustancia "supresiva" y corregir una transcripción errónea debida a una mutación.

Dado el gran interés por el descifrado de los tripletes del código genético, basta con indicar que, gracias a los brillantes trabajos de Nirenberg, Ochoa, Khorana y de sus colaboradores, conocemos actualmente casi todos los tripletes correspondientes a cada uno de los aminoácidos. Estos investigadores han podido llegar a un resultado concreto gracias a las técnicas de la química y de la bioquímica de los ácidos nucleicos, que han permitido sintetizar oligonucleótidos de estructura y longitud conocidas. Prácticamente se ha probado la universalidad absoluta del código gracias a los trabajos llevados a cabo sobre los virus, las bacterias, las plantas y los animales.

Otro dominio importante relativo a la investigación de los ácidos nucleicos es el de las mutaciones, cuya forma más sencilla es la sustitución de una de las bases en el seno de un triplete de ADN. Sabemos ya que algunas sustituciones son más frecuentes que otras y que su incidencia puede aún acrecentarse ya sea incorporando al ADN los análogos de ciertas bases que modifican la especificidad debida al apareamiento de las bases, ya sea, de manera más natural, bajo el efecto de un gen mutante. El conocimiento del código genético, unido a estas observaciones, permite algún optimismo respecto a la posibilidad de inducir mutaciones controladas.

Debemos recordar aquí que los genes y su funcionamiento en los organismos vivos no son fenómenos en sí. Están sometidos a mecanismos de regulación y de control que les inician o les interrumpen, bien separadamente, bien en grupos, respondiendo por *feed-back* (retroregulación) a la presencia de moléculas represivas o activadoras. Los ontogenetistas consideran la activación y la represión de los genes como fenómenos primordiales de la diferenciación y del desarrollo. Cuanto más conozcamos estos represores, estos activadores y sus formas de acción, podremos considerar con mayor optimismo las investigaciones sobre los medios de control y de corrección de los procesos ontogénicos defectuosos.

Herencia citoplásmica

Por último, por una preocupación estética de perfección y en razón de su papel posible en los procesos ontogénicos e infecciosos, menciono aquí la herencia extracromosómica. Orgánulos celulares como las mitocondrias y los plastos, entidades infecciosas como los episomas infecciosos de las bacterias, se reproducen y se dividen independientemente del núcleo; son capaces de mutar y controlar ciertas características típicas de las células que los contienen. Estas características se transmiten según un esquema no mendeliano, más frecuentemente por la célula madre.

Todas las entidades de este tipo estudiadas hasta el presente contienen ADN bicatenario de alto peso molecular. Me agrada saber que las mitocondrias de *Neurospora* crecen y se dividen, contienen ADN y que un carácter citoplásmico de *Neurospora* es transmitido de célula en célula por mitocondrias puras aisladas, como lo hemos demostrado en nuestros laboratorios⁷. Muy recientemente los doctores Luck y Reich han establecido que la duplicación del ADN mitocondrial es semi-conservativa, como la del ADN de las bacterias, las plantas, los animales y ciertos virus. Igualmente han puesto de manifiesto, estudiando la diferencia de densidad específica de las generaciones sucesivas, que este ADN mitocondrial es transmitido por la célula madre. Wodward y Munkres han sugerido recientemente que el ADN mitocondrial transmitido por la célula madre de mutantes de *Neurospora* portadores de una deficiencia respiratoria estaría implicado en el control de la síntesis de las proteínas estructurales de las mitocondrias. En los microorganismos, los efectos de agentes tales como la proflavina, la estreptomina y la nitrosoguanidina hacen pensar que la quimioterapia podrá un día permitir controlar la duplicación del ADN extracromosómico.

Los ácidos nucleicos en patología

A la luz de esta visión de conjunto de los principales puntos de la investigación de los ácidos nucleicos, volvamos a mis predicciones relativas al porvenir de la medicina. Espero que consiga hacer comprender que los fenómenos fundamentales de problemas tan variados como la infección viral, las enfermedades metabólicas, los defectos de desarrollo y los cánceres son del mismo orden. Espero también haber expuesto que estos

7. Ver "¿ADN mitocondrial?", *Atomes*, núm. 233, p. 362.

fenómenos fundamentales implican cambios anormales, debidos bien a interferencias con las secuencias normales de la biología molecular que enlazan los genes con los enzimas, bien a los cambios en estas secuencias.

La infección viral introduce nuevo material genético que interfiere con el funcionamiento de los genes del huésped. Una mutación modifica los genes, generalmente de manera desfavorable, y se traduce, por ejemplo, en enfermedades metabólicas caracterizadas por anomalías enzimáticas.

Las malformaciones pueden deberse a mutaciones (patizambo, labio leporino), a una infección viral (rubéola) o probablemente a un adenovirus, a drogas como la actinomicina o la talidomida, o también al medio neonatal (deficiencia de riboflavina). Algunos de estos factores del medio ambiente cambian probablemente la secuencia espacio-temporal de la activación y de la expresión del gen necesaria para un desarrollo normal. Ciertas malformaciones son debidas a un cromosoma excedente, como es el caso del mongolismo o de los síndromes de Turner y de Klinefelter. El efecto de estos cromosomas se debería a una expresión defectuosa de los genes, modificada por un desequilibrio de la balanza cromosómica. Una publicación australiana reciente adelanta una hipótesis muy interesante, según la cual un agente infeccioso desconocido que afecte a la oogénesis impediría la disyunción que se traduce en el mongolismo por la aparición de un tercer cromosoma en el par 21. Si esto es verdad, vemos posible en ello la aplicación terapéutica.

Algunas anomalías del desarrollo se acompañan de deficiencias hormonales a las que son a veces atribuibles (la de la tiroxina en el cretinismo, o de la hormona somatotropa en un tipo de enanismo, por ejemplo). El modo de acción de las hormonas es aún desconocido. No obstante, recientemente, las bellísimas experiencias de Kidson y de Kirby han demostrado que numerosas hormonas, en particular las hormonas sexuales y la hormona de los insectos, la ecdisona, tienen una acción reguladora sobre la actividad de los genes en las células interesadas, traduciendo esta acción por la producción de m-ARN. Sin embargo, no están excluidas otras formas de acción, entre las que la permeabilidad de la membrana celular puede, según Horowitz, jugar un papel.

El último dominio en el que me detuve, el del cáncer, es a la vez el mayor y el más complejo de los problemas que se plantean actualmente. Esta complejidad, que reside principalmente en la variedad de fenómenos implicados en el origen y la manifestación de cánceres es, intelectualmente hablando, una razón de optimismo, puesto que ofrece la posibilidad de comprender el proceso de la carcinogénesis, sea ésta espontánea, viral,

inducida química o físicamente. Todos estos aspectos parecen incriminar en primer lugar el material genético. Se puede ser también optimista en lo que concierne a la interpretación y el trato de las manifestaciones, ya que parecen comprender diversas etapas de la expresión de los genes.

Esta tesis general está confirmada por el descubrimiento de una cantidad creciente de cánceres animales provocados por partículas virales, según un proceso fundamentalmente análogo a la lisogenia en las bacterias. Parece que los genes virales introducidos así estén integrados en el genoma de la célula huésped, que transforman en célula tumoral dotada de nuevas propiedades características: desaparición de la inhibición de contacto, cambios morfológicos y modificación de factores necesarios para el crecimiento, aparición de nuevos antígenos tumorales y virales. El estudio detallado de los procesos de transformación inducidos por el virus humano o animal en los cultivos de tejidos, las investigaciones que muestran la necesidad de un virus auxiliar asociado al virus tumoral en la carcinogénesis en los animales y los estudios epidemiológicos del cáncer humano entre otros (como sucede con la linfomatosis maligna o las leucemias) nos acercan siempre más a una explicación en cuanto al papel de los virus en los cánceres humanos.

Terapéutica y genética

Las posibilidades preventivas y terapéuticas serían entonces múltiples y variadas, yendo de la prevención de la infección a la de la duplicación, de la expresión y de la integración del material nucleico viral, quizás con la ayuda de agentes antivirales tales como el HBB, la guanina y el IUDR⁸, hasta una quimioterapia específica que desemboque en la destrucción de las células modificadas, o incluso a su reconversión en la normal.

Numerosos autores, como yo, han dado su opinión sobre la explotación técnica de los conocimientos recientes de la genética y de la biología molecular con vistas a mejorar la vida humana y a actuar sobre la herencia. Desde esta óptica, las intervenciones eugenésicas tienen un efecto al nivel de los genes existentes y traducen un esfuerzo voluntario y consciente para atenuar la prevalencia y la expresión de genes indeseables. Este esfuerzo no será coronado por el éxito más que en la medida en la que los genes desfavorables sean identificados, en la que se disponga de

8. HBB = hidroxibenzil benzimidazol. IUDR = yodo uracilo desoxirribósido.

métodos que permitan la detección de estos genes "silenciosos" en los portadores, y sobre todo en la medida en la que los seres humanos acepten su responsabilidad social y se abstengan de perpetuar tales genes.

La intervención eugenésica se sitúa en el estadio de la expresión fenotípica de un gen. Aunque el término haga retroceder a algunos, la eugenesia se practica ya en medicina bajo la forma de administración de vitaminas y de hormonas como la insulina o la tiroxina. Se encuentran ejemplos todavía más sintomáticos en la prevención de la acumulación nefasta de productos tóxicos debidos a desórdenes genéticos, por restricciones dietéticas, como la de la fenilalanina en la fenilcetonuria, de la galactosa en la galactosemia, de ciertos aminoácidos ramificados en la enfermedad del jarabe de arce o en la acidemia isovalérica descrita recientemente. Estas enfermedades son de gran interés, pues van todas acompañadas de retraso mental. Este hecho, asociado a la acción de las drogas como el LSD (ácido lisérgico), permite prever la comprensión, a partir de bases orgánicas, de otras enfermedades como la esquizofrenia y su tratamiento eficaz.

Otro tipo de intervención eugenésica mucho menos desarrollado podría utilizar los conceptos de la regulación y del control de los genes mediante una regulación en *feed-back* por administración de cuerpos aún por descubrir. Por ejemplo, la actividad de los genes dominantes nefastos podría teóricamente ser inhibida a voluntad e invertirse o desinhibirse los genes inactivos, incluso *in utero*, en el transcurso de los períodos críticos del desarrollo. Como ya he dicho, la terapéutica hormonal representa probablemente este tipo de regulación genética.

Definiría la intervención genética como la modificación de genes presentes en un individuo. Esto podría ser realizado bien por una mutación directa, bien reemplazando los genes existentes por otros. Dándose los medios que permitan operar este desplazamiento, no hay en principio más que diferencias técnicas mínimas entre las manipulaciones genéticas en las células germinales y en las células somáticas, aunque el resultado final sea considerablemente diferente. En los sistemas microbianos, existen ya precedentes en cuanto a la introducción o a la transferencia de genes de una célula a otra, y se están llevando a cabo ensayos en cultivos de células de mamíferos. Aislado, el ADN puede ser integrado al genoma bacteriano receptor en el transcurso del proceso de transformación, en donde un virus le transporta de una bacteria a otra, por una transducción seguida de integración. Si tal operación puede ser realizada en las células animales, la

genética de las células somáticas de mamíferos se beneficiaría de ello ampliamente.

Es importante apuntar que la corrección fenotípica de la mayor parte de los errores genéticos no exige el reemplazamiento por un gen activo más que de uno solo de los dos genes inactivos presentes en la célula diploide, y que bastaría quizás con realizar esta operación en un número limitado de células del órgano enfermo para restablecer la función deficiente. Se puede imaginar así que la primera "intervención genética" eficaz sea efectuada por medio de un cultivo de las propias células del enfermo, células hepáticas, por ejemplo. El nuevo gen requerido será introducido, bien por mutación dirigida, bien por transducción a partir de las células del donante, bien, incluso, por una transferencia directa de ADN. Algunas células que hayan adquirido el gen deseado serán cultivadas en gran cantidad y reimplantadas en el hígado del enfermo. A medida que nuestros conocimientos aumenten, la eficacia y las posibilidades de este procedimiento podrán ser considerablemente mejoradas por la síntesis del gen requerido y del que él determine según las exigencias del código genético. Este ADN será reproducido *in vitro* y se podrá todavía intervenir aumentando la incorporación y la integración del ADN en las células receptoras.

Una posibilidad biológica de intervención genética aún más audaz ha sido sugerida por los trabajos de Harris, según los cuales la exposición de cultivos de tejidos de mamíferos a la acción de un constituyente aún no identificado de ciertos virus animales puede provocar la fusión de las células presentes, incluso si son de especies distintas. Estas células híbridas pueden sobrevivir y crecer guardando la totalidad o una parte sólo de los componentes cromosómicos de las dos células parentales. La aplicación posible de esta observación a la introducción de nuevo material genético sería de un interés evidente en las intervenciones eugénicas.

Un trabajo interdisciplinario

Está claro que para desembocar en la realización de lo que no es aún más que potencial, los conceptos, las gestiones y las técnicas deberán poner a flote varias disciplinas. Esto es particularmente evidente si se intenta hacer la lista de campos y técnicas en juego e indicar las necesidades para una información y un progreso ulterior.

Un campo importante comprende la elaboración y la síntesis de

sustancias con fin quimioterápico. En la virología, estas sustancias deberán actuar sobre fenómenos de absorción, de penetración y de duplicación. En lo que concierne a la forma de acción de los genes y a la transcripción hacia el m-ARN y las proteínas, existen ya sustancias activas, y otras es previsible que actuarán todavía de manera más específica sobre la estructura del ADN y del ARN y sobre sus relaciones recíprocas.

Cabe imaginar otras "sustancias depresivas" (a la manera de la estreptomycin) que permitirán modificar la transcripción de los ácidos nucleicos al nivel de la síntesis proteica y corregir así los errores genéticos. Otras también, calcadas de las sustancias inhibitoras o reguladoras, deberán ser aisladas o identificadas para permitir modular la actividad de genes específicos.

Una vez establecidas las estructuras de las enzimas clave y la definición completa del código del ADN, será posible considerar, con la ayuda de métodos de síntesis adaptados, una síntesis de genes a voluntad. Quizás esté próximo el tiempo en el que las moléculas de tales genes de síntesis, o aún de genes aislados en el estado puro de su sustrato biológico, podrán ser reproducidos *in vitro*. Con mejor conocimiento de los procesos biológicos y de las técnicas concernientes a la utilización e integración del ADN, estos ADN podrán ser incorporados a los cromosomas. La intervención genética estará entonces a nuestro alcance.

Atomes, diciembre 1966.

5. UN MECANISMO MOLECULAR QUE REGULA LA VIDA: LAS INTERACCIONES ALÓSTERICAS

J. - P. Changeux y D. Blangy



En la célula, las etapas de una cadena de fabricación están aseguradas por los catalizadores biológicos específicos llamados *enzimas*. De una forma general existen tantas enzimas como reacciones químicas efectuadas por la célula —varios millares. Si hay regulación debe referirse en primer lugar a las enzimas. Se ofrecen dos posibilidades: o bien se regula el número de máquinas-útiles-enzimas, o bien se regula su ritmo de funcionamiento, su tasa de producción. De hecho, se han identificado dos grandes grupos de mecanismos reguladores que se refieren uno a la *síntesis de enzimas*, otro a su *actividad*. En uno y en otro caso los circuitos de control ponen en juego dos elementos de estructura fundamentales: *señales reguladoras*, en general moléculas difusibles, de pequeño tamaño, precursoras de productos finales de cadenas enzimáticas, y *macromoléculas receptoras*, que reconocen las señales reguladoras y son capaces de convertirlas en actividad biológica. Estas moléculas receptoras son proteicas y actúan:

* o bien al nivel del soporte de información genética: son los *represores*, que controlan las síntesis de enzimas;

* o bien al nivel enzimático: son las enzimas reguladoras, que poseen una doble función catalítica y reguladora.

La regulación de la biosíntesis de las enzimas: una economía bien comprendida

Desde principios de siglo, un pasteuriano, Dienert, demostraba que en la levadura (y esto se extendió luego a la bacteria *Escherichia coli*) las

enzimas responsables de la utilización del azúcar de la leche, la lactosa, no son sintetizadas más que cuando este azúcar se encuentra en el medio nutritivo. En otros términos, la célula no gasta su energía en producir enzimas si éstas no le son necesarias. Las sintetiza únicamente en el momento oportuno adaptándose a la composición del medio en el que se multiplica. El análisis y la comprensión de este mecanismo de adaptación enzimática han sido obra de F. Jacob y J. Monod, también ellos pasteurianos, y les han valido el premio Nobel. Recordémoslo a grandes rasgos.

La síntesis de las enzimas de utilización de la lactosa y de los azúcares próximos, o β -galactósidos, está bloqueada selectivamente, en ausencia del azúcar, por un represor. Se trata, pues, de un proceso de control negativo. El represor responsable de este control negativo actúa al nivel del soporte de información genética, el ADN, y se opone a la transcripción de los genes estructurales en matrices de ácido ribonucleico mensajero, que son ellas mismas traducidas a cadenas polipeptídicas (a enzimas). Este bloqueo tiene lugar al nivel de un elemento genético especial, el operador, que ordena la puesta en marcha de los genes estructurales que le son adyacentes. El conjunto operador-genes estructurales constituye un operón. Cuando el represor está combinado con el operador, ninguna síntesis tiene lugar. Sobreviene un β -galactósido, el cual se combina con el represor, que se desprende entonces del operador y libera la expresión de los genes estructurales. Entonces se produce la síntesis de las enzimas de utilización de los β -galactósidos. El β -galactósido actúa, pues, como señal reguladora, como *inductor específico* de la síntesis de las enzimas responsables de su propia degradación (Jacob y Monod, 1961).

Una situación comparable se observa en el caso de una cadena de biosíntesis y no de degradación, pero el efecto es inverso. Es el caso, por ejemplo, de la cadena de biosíntesis de un aminoácido, la L-isoleucina. La L-isoleucina es un metabolito esencial de la bacteria *E. coli* y está incorporada a las proteínas, de las que es uno de los constituyentes. Si, del exterior, nosotros suministramos isoleucina a la bacteria, debe esperarse ver que se detiene la síntesis de las enzimas, cuyo papel es fabricar este aminoácido. En efecto, así ocurre: tras la adición de isoleucina exógena, ninguna síntesis nueva de estas enzimas tiene lugar (Umberger, 1956). Se interpreta este fenómeno suponiendo que el represor del operón isoleucina es incapaz de formar un complejo con el operador en ausencia del signo regulador (la isoleucina); al contrario, cuando isoleucina y represor están

asociados, este último adquiere una gran afinidad para el operador, impidiendo así la síntesis de las enzimas de este operón. Esta regulación por *represión* se ha demostrado en numerosas cadenas de biosíntesis.

La puesta en marcha y la parada de las enzimas reguladoras están bajo control de señales biológicas

Volvamos a tomar el ejemplo de la biosíntesis de la L-isoleucina. Hemos visto que si suministramos isoleucina a la bacteria, la síntesis de las enzimas que participan en la fabricación de este metabolito es reprimida. Es importante, sin embargo, si se quiere evitar todo gasto suplementario, que estas enzimas, ya presentes en la bacteria antes de la represión, cesen toda actividad cuando les toque. Se demuestra con la ayuda de precursores radiactivos que, de hecho, la síntesis endógena de isoleucina se detiene instantáneamente en el momento de la adición del aminoácido. Se pueden, pues, aislar las diferentes enzimas de la cadena de biosíntesis y estudiar el efecto de la isoleucina en la actividad de cada una de ellas. Umberger fue el primero (en 1956) en demostrar que se ejerce un control específico a nivel de la primera enzima de la cadena, en la "puerta de entrada" del "centro de producción". Esta primera enzima, la L-treonina-desaminasa, resulta notable y específicamente inhibida por la L-isoleucina, el producto final de la cadena de síntesis.

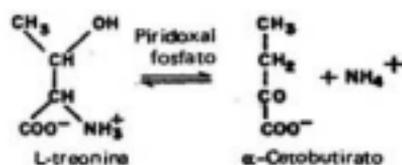
Hay que apuntar aquí que tal mecanismo, llamado de *retroinhibición*, es altamente específico en lo que concierne a la vez a la naturaleza del *efector* y a la de la enzima sensible; sólo la L-isoleucina (con exclusión de cualquier otro aminoácido, incluso la D-isoleucina) es capaz de inhibir la actividad de la treonina-desaminasa, y ninguna otra enzima de la cadena es sensible a este efecto.

En los tres casos citados, el control es de tipo *negativo*, implicando la inhibición de una actividad enzimática. Existen casos diferentes en los que el sistema de control consiste en la *activación* de una enzima: un ejemplo de *control positivo* lo constituye el metabolismo del glucógeno (molécula que se utiliza para el almacenamiento de energía). El glucógeno es sintetizado a partir de la glucosa-6-fosfato por una serie de tres reacciones enzimáticas:

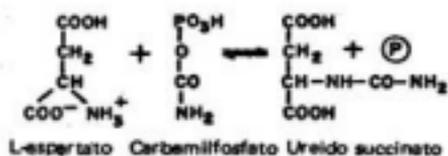
Figura 1. Algunos ejemplos de enzimas reguladoras. Advertirse la importante diferencia de estructura entre los reguladores y el sustrato de las reacciones controladas por tales reguladores. Esta diferencia es particularmente manifiesta en el caso de la síntesis del ácido δ -aminovalérico.

REACCION CATALIZADA

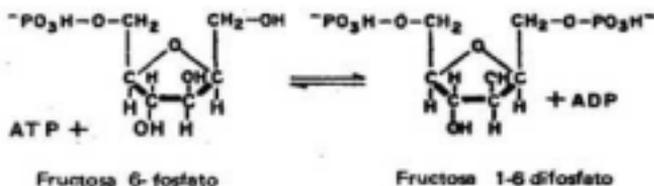
L-treonina-desaminasa de biosíntesis (*E. coli*)



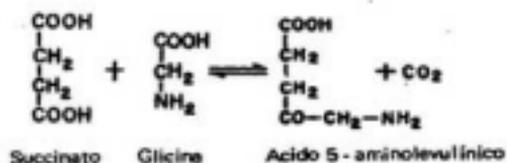
L-espartato-transcarbamilasa (*E. coli*)



Fosfofructoquinasa (*E. coli*)

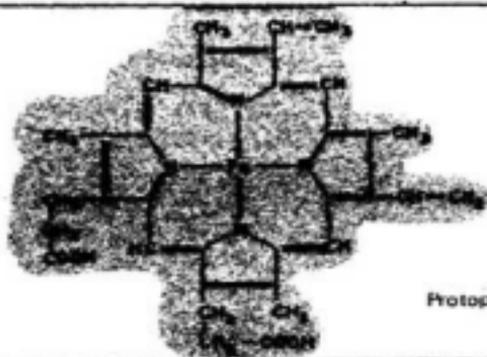
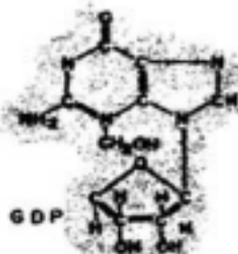
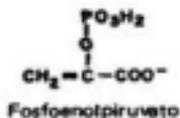
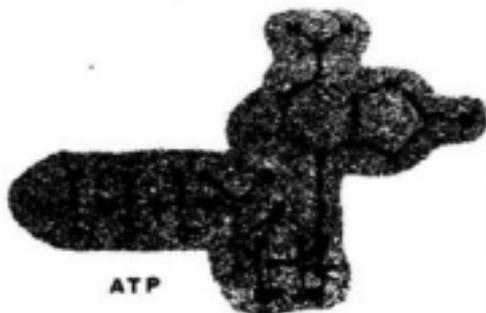
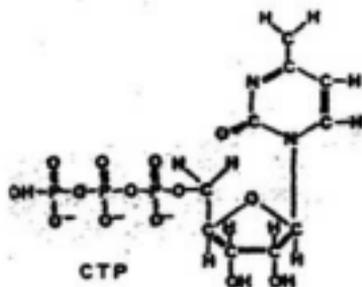
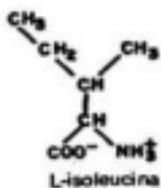


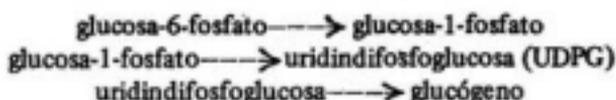
Síntesis del ácido 5-aminolevulínico



INHIBIDOR ALOSTERICO

ACTIVADOR ALOSTERICO





Cuando la célula posee mucha energía, produce grandes cantidades de glucosa-6-fosfato. Esta sirve de señal para *estimular* la síntesis del glucógeno activando especialmente la tercera enzima, que asegura la conversión del UDPG en glucógeno. Si por el contrario, el nivel energético viene a disminuir, la célula va a tener que tomar de las reservas que ha acumulado y, por esto, será necesario activar una enzima que degrade el glucógeno: la glucogenofosforilasa. La señal capaz de activar esta enzima es el monofosfato de adenosina (AMP); el AMP es producido por la ruptura del adenosín-trifosfato (ATP), principal fuente de energía de la célula. Una concentración intracelular elevada de AMP, característica de una célula que ha utilizado buena parte de sus reservas energéticas, lleva consigo la activación de la glucógeno-fosforilasa; esta enzima hidroliza el glucógeno, la hidrólisis libera energía y esta energía es utilizada para regenerar el ATP.

La célula posee, pues, dos tipos de mecanismos capaces de controlar la actividad enzimática: positivo (activación) y negativo (inhibición). Existen casos en los que dos mecanismos intervienen en la regulación de una misma enzima. Esto es lo que se observa en la regulación de la síntesis de los nucleótidos. Estos nucleótidos se combinan en los ácidos nucleicos según proporciones definidas. Para obedecer al principio de economía, es importante que las bases contenidas en los nucleótidos sean sintetizadas más o menos en las proporciones en las que son utilizadas. Ahora bien, purinas y pirimidinas son sintetizadas por cadenas metabólicas paralelas (fig. 1). Es, pues, necesario que la velocidad de producción de cada cadena sea capaz de influir en la velocidad de la otra. Un sistema de regulación recíproco de este tipo implica necesariamente el empleo de dos modos de regulación, positivo y negativo. En *E. coli*, Gerhart y Pardee (1962) han podido demostrar que la cadena de biosíntesis de las pirimidinas es controlada no sólo por su producto terminal, que inhibe su primera enzima (la aspartato-transcarbamilasa), sino también por el producto terminal de la cadena de biosíntesis de las purinas que activa esta misma enzima. El equilibrio entre la producción de purinas y de pirimidinas está, pues, asegurado por el doble efecto de activación y de inhibición sobre la aspartato-transcarbamilasa.

La cooperatividad de enlazamiento entre emplazamientos distintos engendra un proceso de amplificación

Acabamos de ver que existen en la célula enzimas particulares que poseen una doble función: función de catálisis de una reacción química, función de regulación para un metabolito esencial. Estas enzimas reguladoras pueden ser aisladas y estudiadas *in vitro* sin perder sus propiedades, y constituyen un excelente sistema modelo para el estudio de un mecanismo de regulación biológica directamente al nivel molecular. Vamos a ver rápidamente las propiedades fundamentales.

Una primera propiedad fundamental, recordémoslo, es "reconocer" dos clases diferentes de pequeñas moléculas, por una parte el sustrato de la reacción catalizada, por otra parte la señal reguladora. Pero estas enzimas poseen, además, otra propiedad cuyo reconocimiento y análisis resultan esenciales en el desarrollo de los conocimientos sobre los mecanismos reguladores; concierne a su "respuesta" a las variaciones de concentración del sustrato o del efector regulador. Estas enzimas están constituidas de tal manera que sólo son activas en una estrecha zona de concentración de sustrato o de señal reguladora. Una débil variación de concentración les hace ponerse en marcha o les detiene, como las variaciones de temperatura rigen el acondicionamiento de aire de una habitación. En lugar de seguir una ley hiperbólica, la curva de variación de la actividad en función de las concentraciones de sustrato o de efector es sigmoidea (figs. 2 y 3). Un ejemplo muy antiguo de desviación de este tipo es el de la fijación del oxígeno en la hemoglobina (Bohr, 1903). La curva de saturación de la hemoglobina por el oxígeno tiene un trazado sigmoideo, y se puede enlazar esta propiedad con las funciones fisiológicas de la hemoglobina, a saber, el transporte del oxígeno de los pulmones a los demás tejidos. En los pulmones, donde la presión de oxígeno es elevada, la hemoglobina se satura de moléculas de este gas que juega el papel de ligando, mientras que, en los tejidos en los que esta presión es débil, se descarga de su oxígeno.

Si comparamos esta curva con la obtenida en el caso de la mioglobina, que fija el oxígeno siguiendo una curva hiperbólica, advertimos que, en el caso de la hemoglobina, todo transcurre como si la fijación de las primeras moléculas de O_2 facilitara la fijación de las siguientes. El oxígeno es entonces capaz de jugar el papel de regulador para su propia fijación: resulta un proceso del tipo "amplificación" que asegura una perfecta concordancia entre condiciones del medio y fijación de oxígeno. De hecho, se ha podido atribuir rápidamente esta propiedad

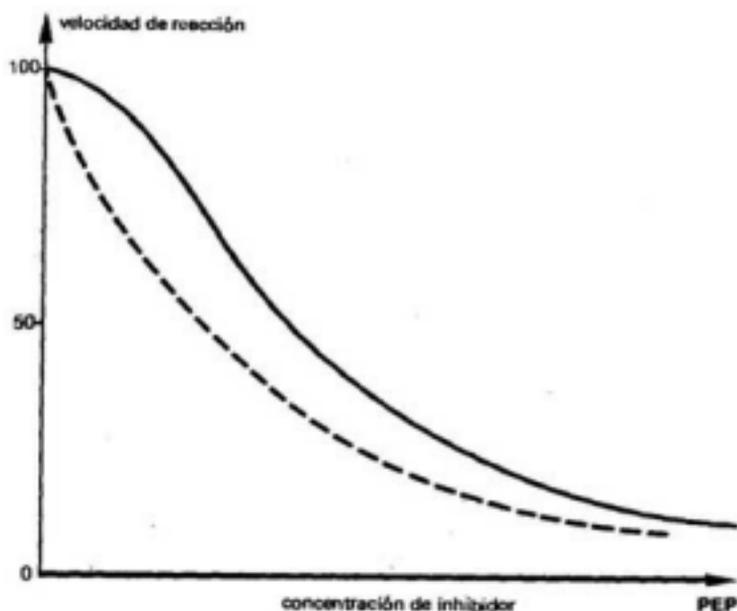


Figura 2. Inhibición de la actividad de la fosfofructoquinasa de colibacilo por un regulador: el fosfoenolpiruvato (PEP). La curva de inhibición no sigue una ley hiperbólica simple como en el caso clásico de inhibición por un análogo de sustrato (curva de trazos); es de forma sigmoidea. La actividad de la enzima se hace sensible a una concentración "umbral" del regulador, lo que facilita su regulación. Esta forma sigmoidea es interpretada sobre la base de efectos "cooperativos" entre moléculas reguladoras análogas a las que intervienen durante la fijación de oxígeno sobre la hemoglobina. (Según Blangy, Buc y Monod, 1967).

importante de la hemoglobina a la presencia de varios emplazamientos de fijación de oxígeno en la molécula; mientras que en la mioglobina no existe más que un emplazamiento de unión por molécula, hay cuatro en la hemoglobina. Y estos cuatro emplazamientos "cooperan" entre ellos en el sentido de que la fijación de una primera molécula de oxígeno favorece la fijación de las tres siguientes. Se han identificado acciones cooperativas del mismo tipo en gran número de enzimas reguladoras: citemos, por ejemplo, la L-treonina-desaminasa, la aspartato-transcarbamilasa, la fosforilasa b, la fosfofructoquinasa de *E. coli*, etc.

De todas formas, la proteína es capaz no sólo de reconocer los signos reguladores, sino también de adaptar su respuesta a la concentración de estos lazos con relación a cierto nivel crítico. Estas moléculas juegan el

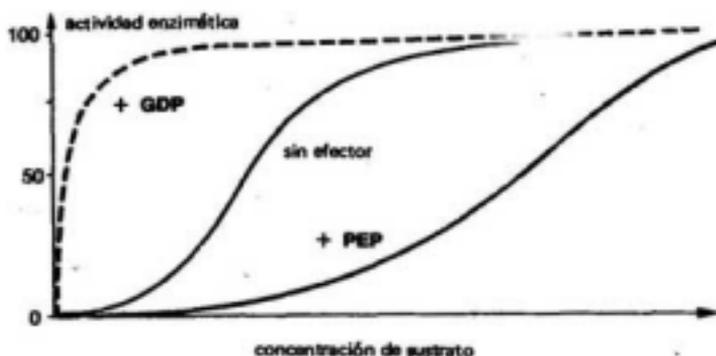


Figura 3. Efecto de dos reguladores: un activador, el guanidindifosfato (GDP), y un inhibidor, el fosfoenolpiruvato (PEP), sobre la actividad de la fosfofructoquinasa del colibacilo. La actividad de la enzima se establece en función de concentraciones crecientes de sustrato. En presencia del activador, la curva de saturación por el sustrato cambia de forma. Se convierte de una sigmoidea en una hipérbola: los efectos cooperativos desaparecen. Esta propiedad, observada desde hace tiempo para la aspartato-transcarbamilasa y la treonina-desaminasa, estuvo en los orígenes de la teoría de las interacciones alostéricas. (Según Blangy, Buc y Monod, 1967).

papel de *integradores biológicos* recogiendo gran número de signos biológicos y proponiendo una solución única expresada en forma de actividad catalítica.

El reconocimiento y la integración de las señales reguladoras: simple propiedad mecánica

El problema de saber cómo la proteína es capaz de transformar el conjunto de señales reguladoras que recibe en una modificación de su actividad biológica; se plantea ahora. La primera constatación importantísima es que el conjunto de estos mecanismos es observado *in vitro* con enzimas aisladas de su medio celular natural, totalmente purificadas y a veces incluso cristalizadas. Resulta obligado admitir que las propiedades reguladoras son inherentes a la enzima misma e inscritas en su estructura. Ahora bien, las enzimas son proteínas constituidas por encadenamientos de aminoácidos: poseen una estructura tridimensional determinada por la naturaleza y el orden de estos aminoácidos. Todas las propiedades observadas están obligatoriamente unidas a la estructura de la proteína. El reconocimiento y la integración de señales reguladoras deben ser simples propiedades mecánicas de estas enzimas. Podremos deducir el mecanismo de la regulación a partir del conocimiento de la estructura de la

enzima, y de la naturaleza de los puntos receptores y por las modificaciones estructurales unidos al reconocimiento de la señal.

Si una estructura característica de la molécula enzimática es responsable del conjunto de las propiedades reguladoras observadas, se debe poder, modificando esta estructura de manera discreta, hacer desaparecer o atenuar el conjunto de mecanismos de integración de las señales reguladoras. Tales modificaciones pueden realizarse, por ejemplo, cambiando la naturaleza de ciertos aminoácidos incorporados en la proteína (mutaciones) o bien por ataque químico específico de ciertos agrupamientos de átomos responsables del mantenimiento de la estructura tridimensional.

Una experiencia de este tipo ha podido ser realizada por primera vez sobre la L-treonina-desaminasa (Changeux, 1961). La exposición de una preparación de enzima a cloruro mercúrico (reactivo de los grupos tioles) se acompaña de la pérdida a la vez de la propiedad de ser inhibido por la L-isoleucina y de la que consiste en tener una curva de unión sigmoidea en función de las concentraciones crecientes de sustrato. La sensibilidad a la señal reguladora así como las propiedades cooperativas de la enzima se pierden en una sola etapa. Este fenómeno de "desensibilización", que ha podido ser reproducido con gran número de enzimas reguladoras, es importante en el plano teórico. Demuestra, en efecto, que el conjunto de propiedades reguladoras representadas por estas enzimas está ligado a un solo y único mecanismo, directamente dependiente él mismo de una estructura molecular característica de la proteína.

Una mayor comprensión del fenómeno implicaba, pues, un estudio detallado de la estructura de estas enzimas y de la naturaleza de los emplazamientos de fijación para los diferentes ligandos.

Volvamos a tomar el caso de la hemoglobina, que ha sido la base de nuestro estudio. Sabemos ya que esta proteína posee cuatro puntos de unión del oxígeno. Más importante es el hecho de que estos cuatro puntos son llevados cada uno por una subunidad proteica distinta. Tal estructura contrasta con la de la mioglobina, que no presenta más que un solo punto de fijación del oxígeno, constituido por una sola cadena polipeptídica. Ahora bien —lo hemos dicho más arriba— la hemoglobina muestra los efectos cooperativos para la unión del oxígeno, pero no la mioglobina.

Se hace lógico asignar la presencia de propiedades reguladoras al hecho de que la molécula proteica está constituida por el conjunto de subunidades distintas idénticas, o diferentes; dicho de otra manera, que posea una *estructura cuaternaria*.

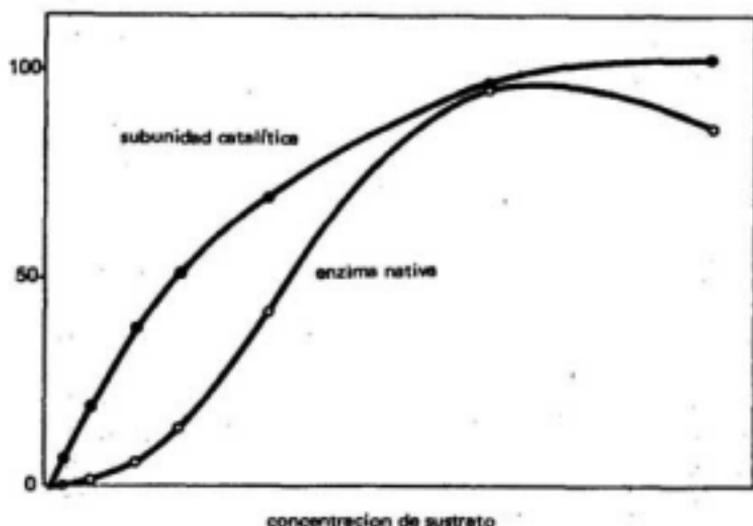


Figura 4. Pérdidas de los efectos cooperativos del sustrato en el momento de la desensibilización de la aspartato-transcarbamilasa. Cuando la enzima es tratada *in vitro* por un reactivo de los grupos tioles (el para-hidroximercuribenzoato) pierde sus propiedades reguladoras pero continúa activa. Se separa en subunidades catalíticas y reguladoras. La unión del sustrato con la subunidad catalítica aislada y purificada sigue una ley hiperbólica sencilla: los efectos cooperativos han sido abolidos. Estos están unidos al estado nativo de la molécula reguladora, a su estructura polimérica y a la integridad de la asociación de las subunidades entre ellas. (Según Changeaux y Gerhart, 1967).

Las experiencias de Gerhart y Schachman (1964) sobre la aspartato-transcarbamilasa ofrecen una demostración particularmente espectacular de esta proposición. Bajo la acción de diversos agentes químicos, entre otros los reactivos de agrupamientos sulfhidrílos, o tioles, la aspartato-transcarbamilasa, como la L-treonina-desaminasa, pierde sus propiedades reguladoras pero queda enzimáticamente activa; se "desensibiliza" (fig. 4). De hecho, esta desensibilización se acompaña de la escisión de la molécula enzimática en subunidades; la enzima pierde su estructura cuaternaria. Estos autores han podido demostrar que, en estas condiciones, se obtienen dos tipos de subunidad de peso molecular diferente. Una subunidad, llamada catalítica, es enzimáticamente activa. La otra, desprovista de actividad catalítica pero capaz de fijar los efectores reguladores CTP y ATP, se encuentra, pues, especializada en una función reguladora. Estudios recientes, hechos por Weber y Lipscomb (1968), han demostrado que la

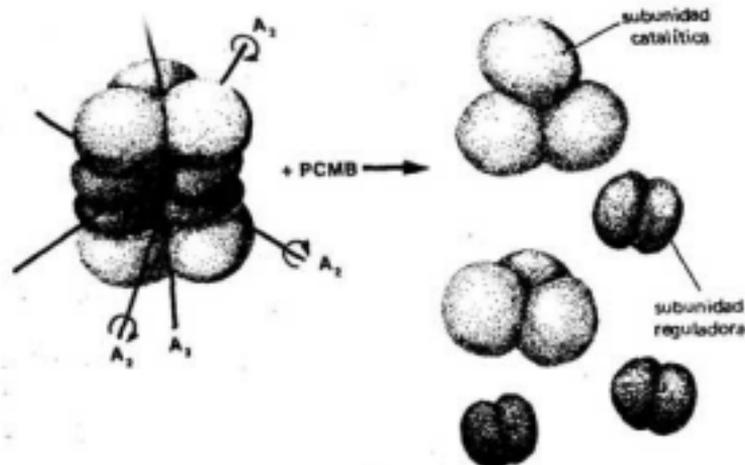


Figura 5. La aspartato-transcarbamilasa, la primera enzima de la cadena de biosíntesis de las bases pirimídicas, está constituida por el conjunto de seis cadenas catalíticas (peso molecular: 33.000) y de seis cadenas reguladoras (peso molecular: 17.000) llevando cada una, con toda probabilidad, o bien un emplazamiento catalítico específico de sustratos (L-aspartato y carbamilsfosfato), o bien un emplazamiento regulador específico de reguladores (R), el citidín-trifosfato y el adenosín-trifosfato. En presencia de un reactivo de grupos SH, el parahidroximercuribenzoato, la enzima pierde sus propiedades reguladoras, y se escinde en unidades catalíticas y reguladoras. (Según Gerhart y Schachman, 1965, y Weber, 1968).

enzima está constituida por el conjunto de seis cadenas catalíticas y de seis cadenas reguladoras, que lleva cada una probablemente un solo punto de fijación ya sea para el sustrato, ya sea para el efector regulador (fig. 5).

Los mensajes reguladores son transmitidos a los emplazamientos catalíticos por interacciones "indirectas" o alostéricas

Acabamos de ver que las propiedades de integración de las enzimas reguladoras estaban unidas a una propiedad "integral" de su molécula: el conjunto de sus subunidades en una molécula coherente dotada de diferentes juegos de emplazamientos idénticos, para el sustrato y las señales reguladoras. Ahora se plantea el problema de saber cuál es el mecanismo molecular que, recurriendo a la presencia de subunidades, permite la interacción de estos puntos.

Cabe proponer al menos dos mecanismos. O bien están los puntos suficientemente próximos unos de otros como para que se establezcan interacciones *directas* entre puntos o bien estos puntos son topográficamente distintos en la superficie enzimática y tienen lugar (fig. 6) interacciones *indirectas* o *alostéricas* (Monod, Changeux y Jacob, 1963). Se ve uno obligado a postular que estas interacciones se efectúan por mediación de una reforma de estructura de la molécula proteica —de un *cambio de conformación* (fig. 7).

Está fuera de lugar discutir aquí el conjunto de argumentos que han llevado a demostrar que las interacciones reguladoras son, en general, interacciones alostéricas. El mejor ejemplo es aún la hemoglobina, cuya estructura fina ha sido revelada por los métodos de difracción de rayos X. En primer lugar, los grupos *hemo*, sobre los que se fija el oxígeno, están alojados más de 30 angströms unos de otros, lo que excluye toda interacción directa entre estos puntos. Mejor aún, Perutz y sus colaboradores han identificado diferencias estructurales notables entre la hemoglobina reducida y la oxigenada. Estos cambios de conformación son menores en el sentido de que no hacen intervenir ni una ruptura de enlace covalente ni un desarrollo completo de la cadena polipeptídica. Se manifiestan principalmente por un cambio de posición de unas subunidades en relación con otras; las modificaciones estructurales de las subunidades mismas quedan por debajo del límite del método.

Resultados parecidos se han obtenido con varias enzimas reguladoras típicas, tales como la aspartato-transcarbamilasa, la fosforilasa b, etc. Los métodos físico-químicos utilizados para mostrar los cambios de conformación que acompañan al enlace de efectores reguladores son *ópticos* (espectroscopia diferencial; poder rotatorio; dicroísmo circular; resonancia magnética-electrónica), *hidrodinámicos* (coeficiente de sedimentación, peso molecular) o *químicos* (reactividades de cadenas laterales de aminoácidos: cisteínicas, por ejemplo).

El conjunto de resultados obtenidos permite pensar que la transición molecular resultante de la fijación de una señal reguladora concierne a la vez a la estructura tridimensional de las subunidades y a su forma de asociación.

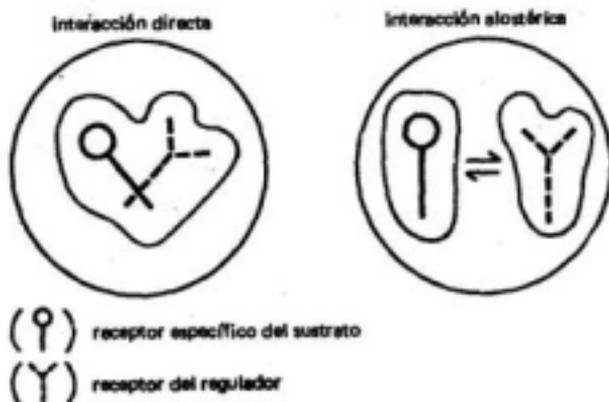


Figura 6. Interacciones directas e interacciones alostéricas. En la hipótesis de la interacción directa, los receptores específicos del sustrato y del regulador se superponen o están suficientemente próximos para permitir una interacción directa o estérica entre sustrato y regulador. En la interacción alostérica, los receptores catalíticos y reguladores son topográficamente distintos en la superficie de la molécula enzimática. Las interacciones entre estos puntos son indirectas y transmitidas por la molécula de enzima por mediación de un cambio de conformación. (Según Changeux, 1961).

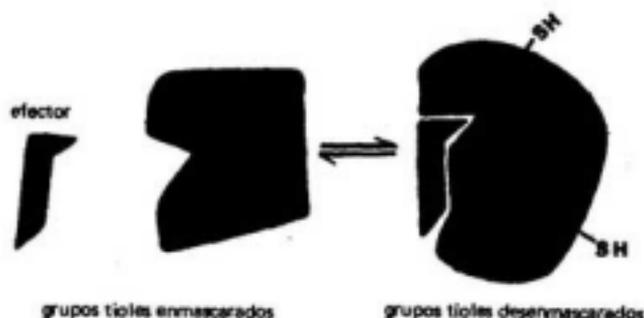


Figura 7. Cambio de conformación de una molécula proteica: la unión de un efector se acompaña de una reorganización de la estructura espacial de la molécula, ilustrada aquí por el desenmascaramiento de grupos tioles.

Los trabajos más recientes confirman la teoría de las interacciones alostéricas

Teniendo en cuenta estas observaciones, Monod, Wyman y Changeux elaboraron en 1965 una teoría que da cuenta cuantitativa y cualitativamente del conjunto de fenómenos observados. Se han interesado en particular en interpretar la cooperatividad de enlace de un ligando dado sobre la base de una estructura cooperativa de la molécula proteica. Las principales hipótesis físicas de esta teoría son las siguientes:

1.^a Las proteínas alostéricas que manifiestan efectos cooperativos se supone que tienen una estructura oligomérica, es decir, que están constituidas por varias subunidades idénticas, o protómeros, teniendo cada una un punto único de fijación para cada uno de los enlaces estereoespecíficos. La molécula de proteína puede compararse a un cristal microscópico cerrado.

2.^a El protómero puede existir bajo dos estados conformacionales al menos, que están en equilibrio reversible.

3.^a La transición de un estado a otro tiende a concertarse para el conjunto de protómeros, es decir, que la equivalencia de los protómeros se conserva en el transcurso de esta transición.

4.^a Los diferentes estados conformacionales difieren en su afinidad hacia los ligandos específicos.

Resulta de ello que la presencia de un ligando dado desplazará el equilibrio entre estados conformacionales, y se observarán interacciones cooperativas que resultan únicamente de las modificaciones de este equilibrio.

Estas hipótesis físicas pueden ser traducidas a un modelo matemático sencillo. En ese momento, se puede decir que las enzimas alostéricas que han sido estudiadas con detalle (fosfofructoquinasa, fosforilasa, aspartato-transcarbamilasa) tienen un comportamiento que está cualitativa y a menudo cuantitativamente de acuerdo con las predicciones teóricas.

¿La noción de transición molecular como resultado de la fijación de un ligando regulador es exclusivamente aplicable a las enzimas de regulación, es decir, a las moléculas dotadas de actividad catalítica? Todo lleva a pensar, por el contrario, que se trata de un mecanismo general de interacciones reguladoras elementales.

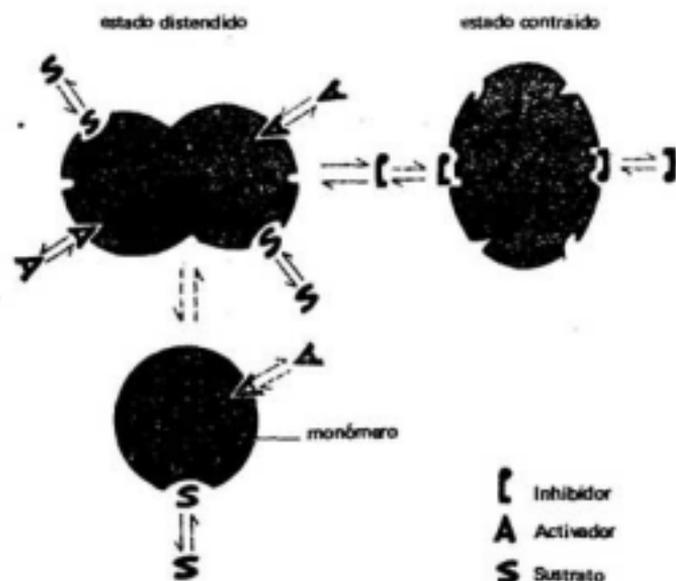


Figura 8. Ilustración de la teoría propuesta por Monod, Wyman y Changeux (1965) para interpretar las propiedades alostéricas de las enzimas reguladoras. El monómero disociado ya no es capaz de transmitir el mensaje de los efectores reguladores al emplazamiento catalítico. (Según Changeux, 1964).

(X) Hemos discutido al principio de este artículo sobre la regulación de la biosíntesis de las proteínas. El represor genético puede ser considerado como una proteína reguladora típica cuya actividad biológica es bloquear la transcripción de genes de un mismo operón combinándose con el operador. Ahí aún se puede postular que el represor existe bajo dos conformaciones, una activa, con fuerte afinidad por el operador, la otra inactiva y de poca afinidad. Un inductor tal que un β -galactósido estabilizaría preferiblemente el estado inactivo del represor, liberando así la maquinaria de la biosíntesis de las cadenas polipeptídicas.

Esta teoría incluso se ha extendido recientemente en las membranas excitables que responden al enlace de mediadores específicos como la acetilcolina (Changeux, Thiéry, Tung y Kittel, 1967; Changeux y Poldleski, 1968). Se trata, por ejemplo, de las membranas sinápticas del sistema nervioso, central o periférico. La respuesta de la membrana tampoco es un cambio de la actividad catalítica de enzimas, sino una modificación de sus propiedades de permeabilidad a los iones, en particular a los Na^+ y K^+ . Ahí todavía se concibe que los protómeros constitutivos de la membrana puedan existir por lo menos bajo dos estados conformacionales: uno, poco

permeable a los iones, corresponde a la membrana en reposo, otro, más permeable, a la membrana excitada. La respuesta de la membrana al mediador químico resultaría de la estabilización del estado altamente permeable, que produce por ello cambios de iones y el paso de corriente eléctrica a través de la membrana.

Diversos resultados experimentales muy recientes tienden a sugerir que estas ideas son, al menos en parte, fundadas, y hay, pues, alguna esperanza en que los procesos fundamentales del sistema nervioso central puedan ser comprendidos al nivel molecular en los años venideros. Debe ser posible descubrir un día las bases moleculares de la inteligencia.

Atomes, abril 1969

**6. LA MITOCONDRIA:
CENTRAL ENERGETICA DE LA CELULA**

Pierre Volfin

1. Como las células administran su energía

Al biólogo Szent-Gyorgy le gusta recordar lo desconcertado que se quedó por la complejidad y la infinita riqueza de la materia viva cuando decidió consagrarse a la investigación. En un principio pensó trabajar sobre el animal completo pero, rápidamente, juzgó esto demasiado complicado. Decidió entonces estudiar bacterias y se tropezó con un problema apenas más sencillo: éstas constituían en sí un universo completo. Por eso se hizo bioquímico, pensando que era sin duda más sencillo considerar aisladamente los elementos de la materia viva y los mecanismos cuánticos que los rigen. Lo que se nos escapa casi totalmente es la continuación de etapas que, de la asociación de los protones y de los neutrones en el núcleo atómico, conduce sucesivamente a la formación de moléculas, macromoléculas y orgánulos, después a la de la célula misma. Cada estadio de esta construcción es fascinante y, si a nivel de las macromoléculas existe cierta inteligencia, es prudente que podamos hablar de los orgánulos, sobre todo cuando se trata de las mitocondrias, que juegan un papel de tal importancia en la célula. Vamos a intentar descubrir su mecanismo pieza por pieza en el curso de este breve estudio de las mitocondrias en los animales superiores.

Aerobios y anaerobios

La vida de una célula se caracteriza por la oxidación de sus alimentos, la captura y el almacenamiento de energía liberada bajo forma de una molécula rica en energía, el ATP. La vida anaerobia que presentan ciertas bacterias, así como las células cancerosas, constituye un verdadero

despilfarro energético. En contraste, en las mitocondrias de las células aerobias, el acoplamiento de la oxidación de los alimentos con la síntesis de ATP se realiza con un rendimiento máximo.

Las células necesitan energía para vivir. Sin una aportación energética, las células cesan de desarrollarse, de moverse, de transportar iones, y mueren cuando han agotado todas sus reservas y quemado todos sus sustratos metabólicos. Las radiaciones solares, que son captadas y acumuladas bajo compuestos reductores de forma la por las plantas verdes en el curso de las reacciones de la fotosíntesis, proporcionan casi toda la energía utilizada por los organismos vivos. La oxidación de moléculas orgánicas complejas, como la glucosa, a costa del oxígeno molecular, es la primera reacción productora de energía química en la mayor parte de las células heterotrofas. Las células que utilizan el oxígeno se llaman células aerobias. Sin embargo, existen numerosas células heterotrofas, en particular ciertas bacterias u otros organismos sencillos, que no utilizan oxígeno o incluso para las que el oxígeno es un veneno: son células u organismos anaerobios. Una célula anaerobia obtendrá igualmente su energía a partir de la oxidación de moléculas orgánicas complejas, pero en lugar de utilizar el oxígeno, utilizará como agentes oxidantes otro tipo de moléculas. Estas últimas son generalmente llamadas aceptores de electrones. De tal suerte, se comprueba que el oxígeno no es en absoluto necesario para obtener una reacción de oxidación. Una serie de reacciones de oxidorreducción en ausencia de oxígeno recibe el nombre de fermentación. En todas las células, la energía procede ya sea de oxidaciones, ya sea de transferencias de electrones, y esta energía es conservada y transportada en forma de un compuesto químico, el adenosín-trifosfato (ATP).

En el transcurso de la oxidación de los alimentos celulares, el ATP se forma a partir del adenosín-difosfato (ADP), su precursor, gracias a reacciones acopladas. La energía química del ATP se utiliza enseguida en el transcurso de los diferentes trabajos celulares.

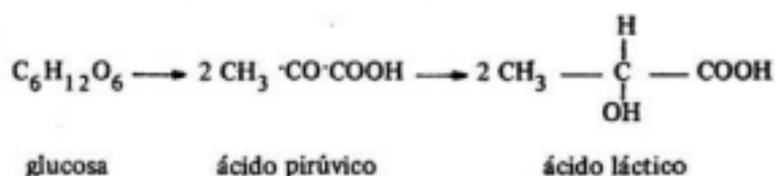
Todos los organismos vivos trabajan de una manera o de otra, aunque sólo sea para estar vivos, en un ambiente por lo general hostil. Pueden, pues, intentar atenuar esta hostilidad ya sea multiplicándose rápidamente, ya sea intentando hacerle frente. En este caso, la célula realizará tres tipos de trabajos: primero el trabajo químico, que consiste en la síntesis de los principales compuestos celulares —las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos— a partir de las más pequeñas moléculas y gracias a la intervención de enzimas específicas. Después está la capacidad de las células para transportar y concentrar ciertas sustancias, los iones

minerales en particular, y esto es el trabajo osmótico. Y por fin está el trabajo mecánico efectuado por todas las células y organismos vivos.

Así en el sistema de transferencia de energía, el ATP es la forma cargada, el ADP es la forma descargada, y existen diversos sistemas enzimáticos que controlan la utilización de esta energía disponible inmediatamente, o bien aseguran la recarga en ATP, elemento esencial de la economía energética de la célula (fig. 1).

En 1941 Lipmann creó un nuevo lenguaje para revelar la noción de fosforilación a los fisiólogos y a los bioquímicos. Representó los enlaces fosfatos ricos en energía por la sigla griega \sim . Hay dos enlaces ricos en energía (\sim) en el ATP y uno solo en el ADP, es decir, enlaces químicos cuya hidrólisis se acompaña de una importante liberación de energía. Mientras que la hidrólisis de un enlace esterfosfato libera teóricamente alrededor de 3.000 calorías por molécula, la energía potencial de un enlace rico en energía es como término medio 10.000 calorías por molécula.

Consideremos los medios de que dispone la célula para formar el ATP: consisten en reacciones aerobias o anaerobias. La degradación *anaerobia* de la glucosa, sustrato movilizable por excelencia en las reacciones energéticas, en dos moléculas de un compuesto con tres átomos de carbono (el ácido pirúvico o el ácido láctico) sin intervención de oxígeno, se realiza según las reacciones siguientes:



En el transcurso de esta transformación se forman dos moléculas de ATP, y esta secuencia de reacciones que constituyen la glucólisis es, sin lugar a dudas, la mejor conocida de todas las que se producen en los sistemas multienzimáticos celulares. Es un conjunto de reacciones sencillo y en cierta medida primitivo. Las once enzimas que lo constituyen están en solución en el citoplasma, no están ni agrupadas ni organizadas en el seno de ninguna estructura celular y el rendimiento energético obtenido es bastante mediocre. En efecto, la glucólisis proporciona 52.000 calorías a partir de una molécula de glucosa, cuando la célula puede obtener teóricamente 686.000 calorías siempre que la molécula sea oxidada

totalmente en gas carbónico y en agua. Así, la vida anaerobia demuestra ser un verdadero derroche si se la compara con la vida aerobia. En un animal superior *aerobio*, el piruvato y el lactato, productos de la glucólisis, van a ser oxidados y extraída toda la energía posible de la molécula de glucosa inicial. Este derroche es, pues, lo que distingue a los organismos anaerobios estrictos (en general algunas bacterias) de los seres más evolucionados del reino vegetal y animal. Este gasto, esta vuelta a las épocas primitivas y desordenadas, es lo que encontramos en las células cancerosas, que fermentan formidables e inútiles cantidades de glucosa, descuidando su capacidad de utilizar el oxígeno presente y de respirar.

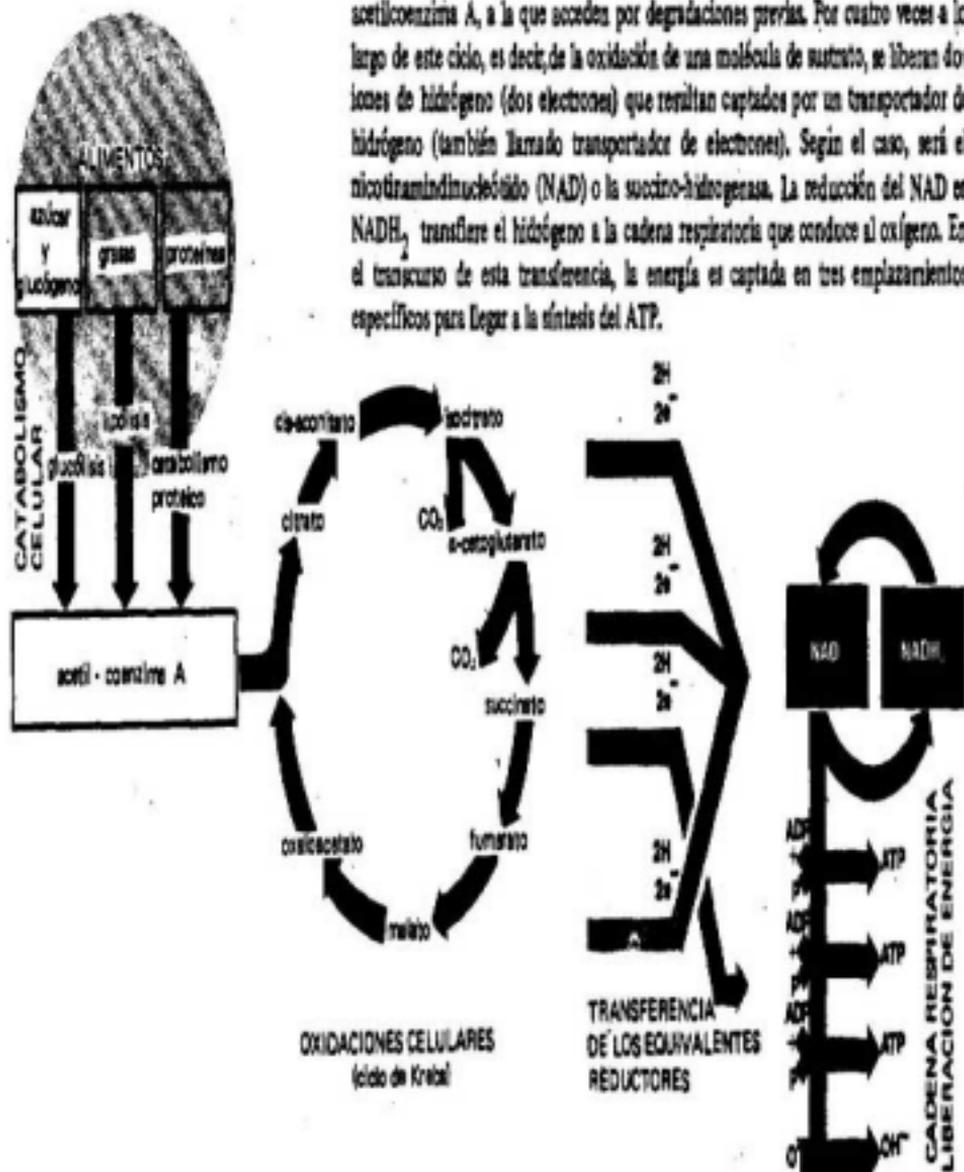
La principal fuente de energía de las células aerobias es la respiración, es decir, la oxidación enzimática de las moléculas combustibles



Figura 1. Los adenín-nucleótidos, ATP, ADP, AMP, juegan un papel esencial en la transferencia de energía celular. Derivan unos de otros por las reacciones siguientes:

- ATP por la reacción $ADP + \text{fosfato}$, que es la reacción de las fosforilaciones oxidativas.
- ADP por la reacción $ATP \rightarrow ADP + P$, catalizada por la enzima adenosín-trifosfatasa o ATPasa.
- AMP gracias a la reacción catalizada por la enzima adenilato-quinasa: $2 ADP \rightarrow AMP + ATP$.

Figura 2. Oxidación de los alimentos celulares. Los alimentos celulares, azúcares o hidratos de carbono, ácidos grasos y aminoácidos, son oxidados por un ciclo de reacciones llamado ciclo de Krebs. Son introducidos bajo una forma única, la acetilcoenzima A, a la que acceden por degradaciones previas. Por cuatro veces a lo largo de este ciclo, es decir, de la oxidación de una molécula de sustrato, se liberan dos iones de hidrógeno (dos electrones) que resultan captados por un transportador de hidrógeno (también llamado transportador de electrones). Según el caso, será el nicotinamindinucleótido (NAD) o la succino-hidrogenasa. La reducción del NAD en NADH_2 transfiere el hidrógeno a la cadena respiratoria que conduce al oxígeno. En el transcurso de esta transferencia, la energía es captada en tres emplazamientos específicos para llegar a la síntesis del ATP.



por el oxígeno. El sistema enzimático implicado es infinitamente más complejo que el de la glucólisis que, ya lo hemos dicho, se encuentra de forma libre en la fase soluble del citoplasma. Ahí, al contrario, las enzimas están íntimamente asociadas a la estructura mitocondrial y los progresos en su estudio han tenido lugar cuando han sido solubilizadas, lo que ha permitido enseguida su purificación. En la mitocondria, verdadera central energética celular, es donde se produce la totalidad de las reacciones de oxidación que toman el relevo de la glucólisis para degradar el lactato o el piruvato a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Este conjunto de reacciones constituye el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, o ciclo de Krebs, en honor de este gran científico que lo describió el primero en 1927. Consiste en una serie coordinada de reacciones y de transferencias de electrones que desembocan en la formación de energía bajo la forma de enlace fosfato gracias a un proceso, la fosforilación oxidativa aún no dilucidado por completo. En efecto, las dificultades de estudio de las proteínas enzimáticas implicadas en las transferencias de electrones y en la fosforilación oxidativa son todavía más complejas que para el sistema oxidativo, pues su asociación con las estructuras membranosas mitocondriales es más estrecha. En tal sistema, el almacenamiento de energía (reacción endérgica) y su liberación (reacción exérgica) son fenómenos perfectamente acoplados, y este acoplamiento es, entre otros, la característica del buen funcionamiento de la economía celular. Se da uno cuenta actualmente cada vez más de qué manera las membranas juegan un papel esencial en la organización y el control de la actividad de numerosos sistemas multienzimáticos y de qué manera es importante el estudio de las relaciones que existen entre estas estructuras y el funcionamiento de los sistemas enzimáticos enlazados a las membranas. Tal estudio deber permitir que se comprendan mejor los mecanismos de la vida y de la regulación del suministro energético celular (ver la figura 2).

Las mitocondrias y sus sistemas enzimáticos

Las mitocondrias, orgánulos presentes en todas las células aerobias, encierran los sistemas enzimáticos responsables de la oxidación de los alimentos, de la síntesis del ATP y del acoplamiento de estos dos procesos. Constituyen un complejo multienzimático cuya estructura, estrechamente enlazada a la de la mitocondria, es el objeto de intensas investigaciones.

Se encuentran mitocondrias en todas las células aerobias animales y vegetales. Su número por célula varía de 10 a $5 \cdot 10^5$ según los casos. Su

forma y su tamaño son igualmente muy variables pero en general del orden de 3 micras de largo y de 1 micra de diámetro.

Es muy difícil saber quién descubrió primero el papel que jugaban las mitocondrias, que durante largo tiempo no fueron consideradas más que como vulgares artefactos citológicos. Sin embargo, una de las primeras descripciones de Altman tiene hoy una resonancia casi profética, porque advirtió desde 1890 que estas partículas, que él llamó bioplastos, son elementos vivos, capaces, como las bacterias, de vivir independientemente en colonias en el citoplasma de las células huésped. Volveremos a hablar después de la agudeza de tal aproximación entre mitocondrias y bacterias, que son actualmente objeto de investigaciones en numerosos laboratorios.

Después de Altman, los nombres se suceden: Brenda, Michaelis, Otto Warburg, que también, desde 1913, tuvo la idea de la relación que existía entre estos gránulos y la respiración celular. Por último fue Bensley quien, en 1930, abrió la vía de estudios modernos sobre las mitocondrias buscando aislarlas a partir de las células por la técnica de centrifugación diferencial, lo que no fue realizado hasta 1948 por Hegeboom, Shneider y Palade en el *Rockefeller Institute* de New York, utilizando un medio de sacarosa. Sólo entonces las conjeturas se convirtieron en conclusiones, y es así como Kennedy y Lehninger, en este mismo instituto, pudieron



Figura 3. Las mitocondrias están formadas por dos membranas que tienen entre ellas un espacio intermembranoso; en cuanto a las invagaciones y crestas o *crístae*, que se forman en perfecta continuidad con la membrana interna, delimitan el *lumen* mitocondrial o matriz. Sobre esta mitocondria de espermatozoido de ratón, la red continua constituida por la membrana interna es perfectamente visible (flechas). (Cliché Jean André, x 75.000).



Figura 4. Vemos aquí el detalle de la membrana interna de una mitocondria. Ha sido liberada bajo la forma de filamento por un choque osmótico. Su tratamiento por la técnica llamada "de coloración negativa" hace aparecer, al microscopio electrónico, partículas esféricas elementales, las subunidades membranosas. (Cliché Jean André, x 150.000).

demostrar que las mitocondrias, aisladas a partir del hígado de rata, eran capaces de efectuar todas las etapas de oxidación del ciclo de Krebs, y con una velocidad análoga a la medida sobre el tejido intacto. Demostraron que se trataba de oxidaciones fosforilantes, es decir, en cuyo transcurso era fabricado el ATP. Los progresos del microscopio electrónico y los trabajos de Palade y Porter (en el *Rockefeller Institute* y en Sjöstrand, Suecia) permitieron obtener las primeras imágenes de gran resolución y describir con precisión los principales detalles de la estructura de las mitocondrias. La figura 3 presenta un ejemplo de mitocondria de animales superiores, que constituye el tema exclusivo de esta exposición.

La definición morfológica de mitocondria es la de un orgánulo celular limitado por dos membranas. A la más interna están asociadas diversas estructuras, las crestas o *cristae*. La membrana externa es lisa y rodea una membrana interna que lleva numerosas invaginaciones. Son los pliegues de la membrana interna que dan nacimiento a las estructuras llamadas *cristae*. Si se las observa al microscopio electrónico después de una impresión negativa al fosfotungstato, aparecen cubiertas de subunidades esféricas (subunidades de la membrana interna), como muestra la figura 4.

El espacio entre la membrana interna y la membrana externa recibe el nombre de intermembranoso, mientras que el *lumen* delimitado por la membrana interior se llama matriz. Esta matriz tiene una densidad electrónica específica y un aspecto granuloso. Es una estructura organizada y probablemente semirrígida. Las proteínas, que son en ella los elementos

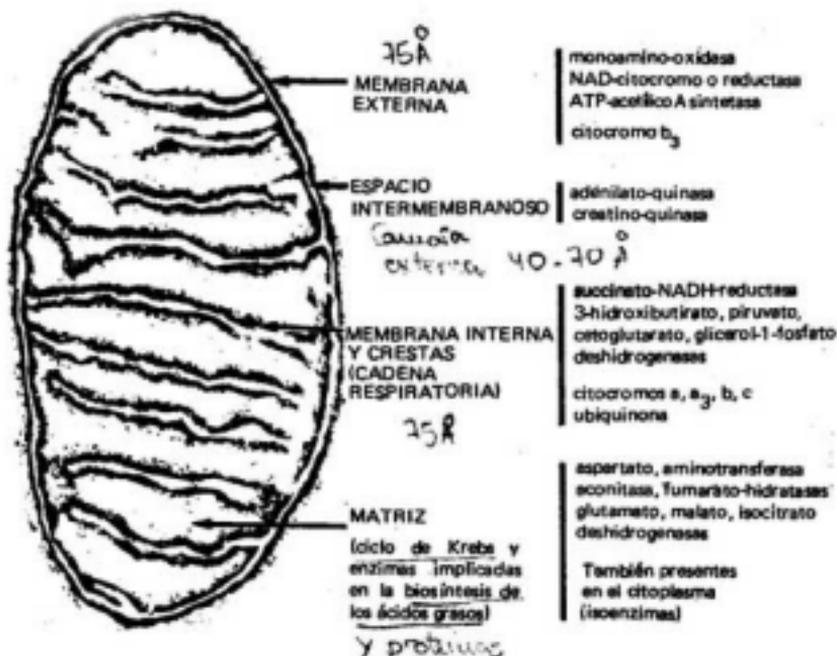


Figura 5. Mediante un fraccionamiento particularmente delicado se ha conseguido establecer este mapa probable de la topografía de las enzimas y de los constituyentes mitocondriales.

esenciales, son solubles, al contrario que las proteínas componentes de las estructuras membranosas. Estas últimas consisten esencialmente en una doble capa de moléculas lipídicas cubiertas por cada lado de moléculas proteicas. La mitocondria está dividida en dos compartimentos:

- *el compartimento exterior, que consiste en el espacio comprendido entre las dos membranas, así como los espacios *intra cristae*,
- *el compartimento interior, que comprende la matriz.

Estos dos espacios están estructuralmente aislados, y es con la significación de esta ultraestructura, unida a la importancia de los problemas de compartimentación y barreras de permeabilidad, con la que ha de enfrentarse el bioquímico cuando quiera comprender y visualizar sus resultados experimentales.

Esta morfología que acabamos de describir define estructuras membranosas que constituyen el soporte de cierto número de actividades

enzimáticas indispensables a la organización funcional, metabólica, de las mitocondrias. La localización de estas enzimas, que ha sido el objeto de numerosos estudios recientes, se revela muy difícil. Se puede intentar aislar fracciones celulares lo más homogéneas posible al microscopio electrónico y determinar la distribución de las enzimas que contienen. Se pueden utilizar también diversas propiedades físicas de las partículas celulares (densidad, coeficiente de sedimentación) para separarlas, generalmente por centrifugación sobre gradientes de densidad. Las actividades enzimáticas son determinadas sobre cada muestra y se obtiene así, para cada enzima, una curva de distribución. Si dos enzimas tienen curvas de distribución diferentes, es que están asociadas a una población de partículas subcelulares diferentes. Se utilizan ciertas enzimas, cuya localización es exacta, como "marcadores"; así, por ejemplo, la citocromo-oxidasa está considerada como una enzima estrictamente mitocondrial. Existen otras enzimas a la vez en las mitocondrias y en el citoplasma; catalizan las mismas reacciones, pero sus formas moleculares son diferentes: se les llama isoenzimas. La compartimentación de las enzimas y de los sustratos es una de las características de la estructura mitocondrial; de ahí el interés por aislar los compuestos enzimáticos de los ciclos oxidativos, por estudiar su estructura molecular, su actividad, y por determinar su localización exacta con el fin de comprender mejor las relaciones que existen entre los diversos sistemas multienzimáticos mitocondriales.

La membrana externa contiene principalmente dos enzimas asociadas más o menos estrechamente con su estructura: la monoamino-oxidasa y una [NAD reducido-citocromo C] reductasa. La membrana externa es permeable a las pequeñas moléculas como la sacarosa, las sales, los nucleótidos, pero impermeable a las moléculas más grandes como la albúmina, la insulina o las polisomas. Esta permeabilidad a los iones pequeños estaría relacionada con el débil contenido de esta membrana en un compuesto: la cardiolipina. Es muy posible que varias enzimas que parecen débilmente enlazadas a las mitocondrias (adenilato-quinasa en el hígado y el músculo, [ATP + creatina-fosfotransferasa] en el músculo) estén localizadas en realidad *in vivo* en el espacio intermembranoso.

La estructura y la composición de la membrana interna son mucho más complejas. En cuanto a la matriz, está enteramente rodeada por la membrana interna y sus invaginaciones: las *cristae* (crestas mitocondriales). Todo compuesto, para alcanzar la matriz, debe atravesar la membrana interna. Ha sido posible trazar el plano probable de la distribución de las enzimas y de los principales componentes mitocondriales (fig. 5). Para

esto, las técnicas utilizadas consisten, por ejemplo, en extracciones mediante soluciones hipertónicas (fosfato), que liberan las enzimas del compartimento intermembranoso. Después de este tratamiento, el sedimento obtenido tras la centrifugación es roto por ultrasonidos, lo que permite obtener las enzimas retenidas en la matriz. En cuanto a las enzimas de la membrana interna y de las crestas, las técnicas de aislamiento, que llevan consigo la utilización de agentes humectantes y de detergentes, son todavía muy delicadas. En este cuadro, vemos, por ejemplo, que las enzimas del ciclo de Krebs están esencialmente localizadas en la matriz soluble. Las enzimas de la cadena respiratoria están adheridas a las membranas, y más exactamente a la membrana interior donde constituyen una importantísima fracción, puesto que representan más del 25 por ciento de las proteínas de las membranas mitocondriales. Están agrupadas con las moléculas transportadoras de electrones en "conjunto respiratorio", gracias a fuerzas físicas y químicas. Un "conjunto respiratorio" lleva un elemento de cada uno de los transportadores de electrones, como veremos más adelante, así como una molécula de la enzima acoplante, que "fabrica" el ATP. Estos conjuntos están situados en la membrana interna a intervalos regulares, y una mitocondria puede contener 15.000, como en el caso de las mitocondrias hepáticas.

Una de las preocupaciones actuales de los investigadores consiste en la reconstrucción *in vitro* de este complejo multienzimático, a partir de elementos aislados y purificados. En tal sistema, las membranas no constituyen sólo un soporte físico de las diferentes enzimas; también son necesarias para su funcionamiento. (Ver sobre este tema el artículo consagrado a las enzimas estabilizadas sobre soporte, *la Recherche*, núm. 13, p. 571).

2. La captura de la energía celular

Hemos indicado que las oxidaciones celulares se producen en el transcurso del ciclo de Krebs; ahora vamos a considerar cómo la energía liberada durante estas reacciones se conserva bajo la forma de ATP, es decir, cómo se realiza este acoplamiento de las reacciones endergónicas y exergónicas sobre el que hemos insistido más arriba.

Desde hace 30 años Keilin y Warburg introdujeron el concepto muy general de oxidación como fenómeno producido por medio de transportadores de electrones dispuestos en una cadena con eslabones de potencial de

alimentos

acetil - co A

ciclo de Krebs

NAH

complejo I

succinato

complejo III

ATP

complejo IV

ATP

- (a) amilasi rotanone
- (b) antitrombina A
- (c) clausuro
- (d) malonato

● = inhibidores

oxidorreducción creciente. Existen tres tipos diferentes de componentes de esta cadena respiratoria: las deshidrogenasas con piridín-nucleótidos como cofactores, las flavoproteínas y los citocromos. En cada vuelta del ciclo de Krebs, hay cuatro reacciones de deshidrogenación. Para tres de éstas un compuesto, el NAD oxidado (difosfopiridín-nucleótido), sirve de aceptor de electrones para las deshidrogenasas específicas que oxidan el isocitrato, el α -cetoglutarato y el malato. Así, se forman tres moléculas de NAD reducido en cada vuelta. Para la otra etapa de oxidación, las parejas de electrones provenientes del succinato son aceptadas por el centro activo de la succinodeshidrogenasa, que es una flavoproteína. Las flavoproteínas

Figura 6. La cadena respiratoria y los puntos de formación del ATP. La cadena respiratoria puede compararse a una escalera; en cada escalón de ella se encontraría un individuo capaz de aceptar una carga de parte de su homólogo situado en el escalón superior y de transmitirla al del escalón inferior. Las cargas son los electrones y los iones hidrógeno incorporados a los alimentos durante la última etapa de su oxidación (el ciclo de Krebs). Cuando se encuentra en estado oxidado, el primer transportador de la cadena respiratoria, FAD, acepta electrones e iones hidrógeno; pasa así al estado reducido, para volver al estado oxidado después de haberlos transmitido al transportador siguiente. Así es como progresivamente, por la oscilación de los transportadores entre un estado reducido y un estado oxidado, electrones e iones hidrógeno llegan al oxígeno del aire, formando agua. Partiendo de un potencial de oxidorreducción muy bajo al nivel del NAD, $e = -310$ mV, la cadena respiratoria les hace llegar a $+790$ mV. Por tres veces en el transcurso de esta ascensión, la diferencia de potencial entre dos escalones permite la síntesis de un enlace rico en energía, almacenada bajo la forma de una molécula de ATP.

Los bioquímicos se han preocupado por establecer la secuencia de los transportadores a lo largo de la cadena respiratoria. Cada compuesto de la cadena presenta en estado reducido un espectro que le es propio. Por esta razón las técnicas espectrofotométricas han jugado un papel clave en la identificación de cada una de las moléculas y permitido, por medidas de cinética rápida, determinar el orden en el que cada una de ellas era sucesivamente reducida (aceptación de H^+) y después reoxidada (transmisión). Estos datos han sido confirmados por la utilización de inhibidores específicos de secuencias dadas; han permitido también localizar los niveles a los que se forma el ATP.

Pero uno no se contenta hoy con tal resultado. Estas reacciones tienen como soporte moléculas, asociadas ellas mismas a estructuras celulares. El objetivo ideal es reconstruir totalmente tal sistema a partir de sus elementos. Se procede para hacer esto a fraccionamientos muy delicados. Esta técnica permitió a Green obtener cuatro complejos. La identificación de sus constituyentes y la determinación de la actividad global de cada uno de estos complejos con relación a los elementos de la cadena respiratoria permiten esbozar el principio de *puzzle* que vemos aquí. El complejo I permite la reducción de la ubiquinona por el NAD reducido. El complejo II permite la reducción de la ubiquinona por el succinato. El complejo III permite la reducción del citocromo c por la ubiquinona. El complejo IV permite la oxidación del citocromo c.

son la segunda clase de enzimas oxidativas, su aceptor de electrones es un flavoadenín-dinucleótido (FAD) que se comporta como un transportador de electrones análogo al NAD, pero que se diferencia de él por su estructura, cuyo elemento esencial es la riboflavina: la vitamina B₂. Los últimos elementos de la cadena consisten en una serie de compuestos, los citocromos, moléculas enzimáticas capaces de transferir los electrones, y están compuestos de agrupamientos activos pigmentados característicos, que reciben el nombre de grupos *hemo*; comprenden un núcleo porfirínico y hierro, como el pigmento de la hemoglobina de los hematíes. Cada citocromo contiene bajo su forma oxidada un átomo de hierro férrico (Fe⁺⁺⁺) que puede aceptar electrones y ser reducido a hierro ferroso (Fe⁺⁺), después ser reoxidado a hierro férrico (Fe⁺⁺⁺), cuando transmite sus electrones el aceptor siguiente. El último eslabón es llamado citocromo-oxidasa, o bien enzima respiratoria: cede directamente sus electrones al oxígeno molecular. Esta transferencia es inhibida por el cianuro a débiles concentraciones, lo que hace de este último un veneno tan tóxico, al bloquear totalmente las oxidaciones biológicas. Así los electrones desembocan en la cadena de citocromos por medio de dos flavoproteínas. Una acepta los electrones que vienen del NAD reducido y la otra los del succinato; las dos dan enseguida sus electrones al citocromo b, sin duda por medio de una quinona: la ubiquinona.

La mayor parte de los conocimientos sobre la naturaleza y la secuencia de los diversos componentes de la cadena respiratoria de la que presentamos el esquema se han obtenido gracias a delicadas técnicas espectrofotométricas puestas a punto en Filadelfia por Chance¹, utilizando la propiedad de cada componente de la cadena respiratoria de presentar un pico característico de absorción en el estado reducido. Todos los componentes de la cadena respiratoria, a excepción de la ubiquinona (coenzima Q) y del citocromo c, están enlazados muy firmemente a la membrana interna; de ahí la dificultad de aislarlos y de reconstruir el sistema completo a partir de cada elemento purificado. Otra de las causas de dificultad viene del hecho de que algunos de estos compuestos cambian de propiedad en el transcurso de su aislamiento. Las deshidrogenasas cesan de ser sensibles a un reactivo que las bloquea selectivamente *in vivo*, el amital, y la flavoproteína, una vez aislada, no reacciona con el citocromo b. Para esto son posibles dos explicaciones: su identificación es inexacta o incompleta, o bien sus propiedades físicas han sido modificadas ya sea

1. B. Chance, C.P., Lee, L. Mela, *Fed. Proc.*, 26, 1341, 1967.

durante su aislamiento a partir de las membranas, ya sea en el transcurso de su purificación.

Los componentes de la cadena de transportadores de electrones han sido aislados bajo la forma de complejos. Green ha obtenido cuatro complejos, cada uno formado por varios compuestos de la cadena respiratoria y por abundante material lipídico que se revela esencial en la actividad del complejo. La asociación de estos elementos con las estructuras membranosas mitocondriales permite al conjunto funcionar armoniosamente, es decir, permite captar bajo forma de ATP la energía liberada durante la oxidación de los electrones recorriendo la cadena respiratoria (fig. 6). El estudio del mecanismo de formación del ATP ha sido posible gracias a la utilización de reactivos químicos de las fosforilaciones oxidativas, de desacoplantes como el dinitrofenol, de inhibidores como la oligomicina. El dinitrofenol, cuando se suma a estas mitocondrias, provoca un aumento de la velocidad del flujo electrónico, suprimiendo el control ejercido sobre este flujo por los sistemas fosforilantes. El dinitrofenol se considera como un desacoplante que provocaría la desaparición de intermediarios hipotéticos, ricos en energía, diferentes al ATP, y que se representan por los símbolos $X\sim I$ y $X\sim P$. Cuando se añade a las mitocondrias oligomicina, se provoca por el contrario una inhibición de la respiración, inhibición que suprime el dinitrofenol. La oligomicina impediría la utilización de los intermediarios ricos en energía ($X\sim I$ y después $X\sim P$) para sintetizar el ATP, y el dinitrofenol provocaría por el contrario la hidrólisis de estos compuestos, particularmente del $X\sim I$.

Estas observaciones, unidas a la utilización de diversos compuestos marcados, en particular el fosfato marcado mediante oxígeno-18, han llevado a establecer un modelo hipotético de las fosforilaciones oxidativas que ilustra la teoría química.

Tres teorías para las fosforilaciones oxidativas

El ATP se sintetiza, en el transcurso del transporte de los electrones liberados durante la oxidación de los sustratos, en tres etapas de la cadena respiratoria que conduce al oxígeno. Tres teorías por lo menos se enfrentan para explicar el mecanismo de estas fosforilaciones oxidativas.

Según la *teoría química*, habría *tres puntos* de conversión de la energía a lo largo de la cadena respiratoria. En cada punto se ha supuesto que las reacciones que tendrían lugar, por ejemplo, a partir de dos

transportadores de electrones, conducirían a la formación de ATP, acompañado de la eliminación de una molécula de agua. La ecuación final es equivalente a la reacción inversa de la catalizada por la enzima que le degrada en ADP: la ATPasa.



La energía libre de esta reacción en las mitocondrias, en condiciones fisiológicas de pH 7, es de 7.500 calorías.

Para confirmar esta teoría química, se han emprendido numerosos trabajos intentando descubrir la naturaleza química exacta de los intermediarios X~I y X~P, pero sin éxito hasta el presente. Una de las razones de este fracaso se debe quizás al hecho de que las técnicas bioquímicas clásicas para solubilizar, aislar y purificar los componentes enzimáticos son inadecuadas. O bien, por otro lado, esto puede deberse a la gran labilidad de las estructuras consideradas. En efecto, si existen compuestos intermedios, ricos en energía (en particular los no fosforilados), deben estar presentes en muy débil concentración y ser muy inestables. Los resultados más alentadores en esta dirección los han obtenido Racker y Sanadi en los Estados Unidos; purificaron las fracciones proteicas capaces, añadidas a subpartículas mitocondriales que habían perdido sus propiedades fosforilantes, de restaurar en éstas el acoplamiento de las fosforilaciones y el transporte de electrones. Estos factores que aparecen son fragmentos de la membrana interna. Pierden sus características cuando son liberados en su estructura madre y las recobran cuando vuelven a unirse a ella. Esto ilustra la necesidad, en cuanto al estudio de las fosforilaciones oxidativas, de resolver el problema planteado por la complejidad de los sistemas enzimáticos de naturaleza membranosa (fig. 7A).

La *teoría químio-osmótica* fue propuesta por el inglés P. Mitchell en 1961², pues no estaba satisfecho de las soluciones propuestas por la teoría química. En particular, no veía cómo, para explicar el mecanismo del acoplamiento, se admitía el acoplamiento de dos reacciones:

- (1) A reducido + B oxidado \rightleftharpoons A oxidado + B reducido
- (2) $\text{ADP} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$

2. P. Mitchell, *Biol. Rev.*, 41, 100, 1966.

es decir, cómo la oxidorreducción estaba acoplada a la eliminación del agua. En el caso de la teoría clásica, las oxidorreducciones y las fosforilaciones tienen lugar por cambio de enlace, gracias a intermediarios químicos comunes a ambas reacciones, y el acoplamiento es realizado en acoplamientos moleculares específicos en el momento de tales cambios entre componentes de las cadenas de oxidorreducción y de deshidratación.

En la teoría quimio-osmótica, no es necesario postular la existencia de intermediarios ricos en energía. La energía respiratoria no sufre un proceso de conversión de tipo químico, sino que es utilizada directamente para separar las cargas + y - de cada lado de la membrana interna de las mitocondrias. Esta teoría tiene, pues, por imperativo absoluto una realidad: la existencia de complejos enzimáticos formando unidades funcionales y como parte integrante de la estructura membranosa, y está fundada sobre la hipótesis de que el ATP es sintetizado por inversión de la actividad de la ATPasa. El punto activo de esta enzima debe situarse en la membrana (fig. 7B). Es también necesario que esta membrana posea una permeabilidad muy específica respecto a los iones H^+ y OH^- , permitiendo a los protones y a los hidroxilos resultantes de la síntesis de ATP escapar hacia las fases opuestas. La reacción catalizada por la ATPasa



puede escribirse siguiendo la ley de acción de masas:

$$(b) \quad (ATP)/(ADP) = (H_3PO_4) / K (H_2O)$$

La ATPasa está situada ciertamente en un ambiente hidrófobo de la membrana. También cabe considerar la actividad del agua representada en la ecuación (b) como si fuera la del punto activo de la enzima. Esta actividad dependerá de la facilidad o no del agua para desplazarse hacia la fase acuosa y de la concentración de los protones de cada lado de la membrana.

Las dos teorías, química y quimio-osmótica, no son inconciliables, sobre todo cuando se confrontan con los datos experimentales. Es cierto, igualmente, que existe una ATPasa anisótropa capaz de jugar el papel de bomba de protones y que se genera un gradiente de pH cuando las mitocondrias sintetizan ATP; pero estos argumentos a favor de la hipótesis quimio-osmótica no son decisivos, pues las cantidades de ATP sintetizado en estas condiciones son muy escasas y el gradiente de pH, que sería

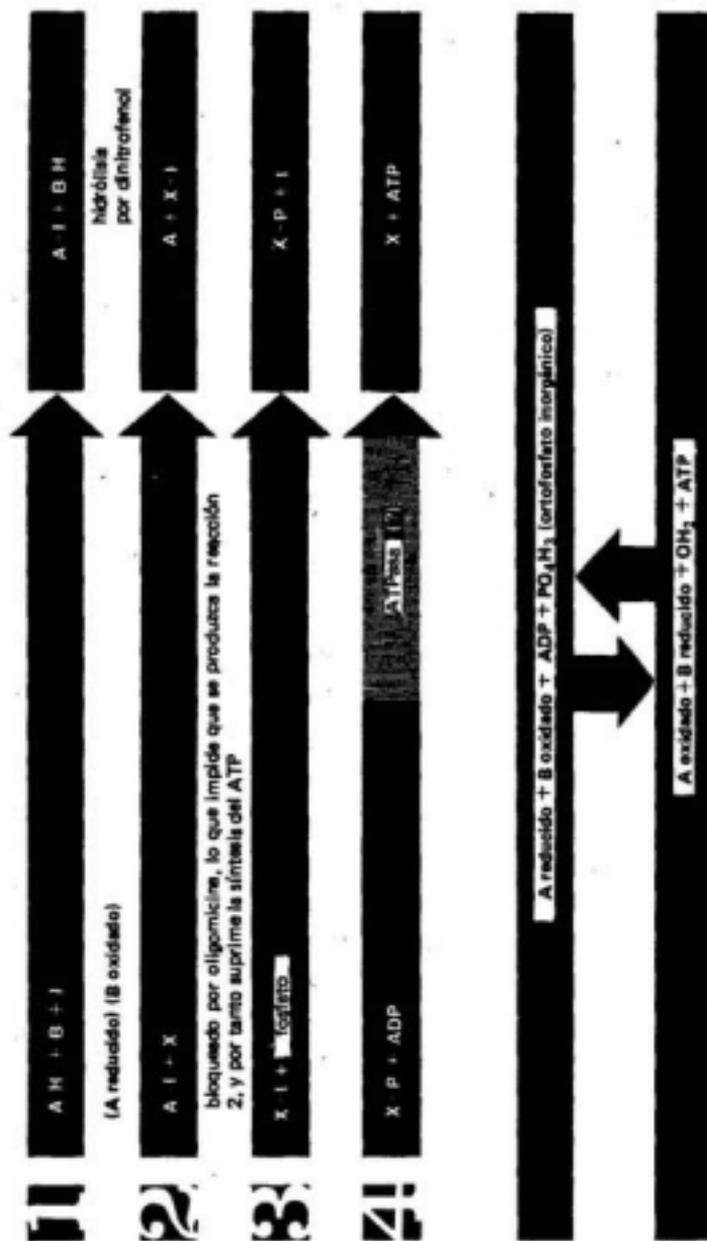


Figura 7. Dos de las teorías propuestas para explicar el mecanismo de las fosforilaciones oxidativas.

Figura 7A. En la teoría química, la explicación de la conversión de la energía en ATP con cada uno de los tres emplazamientos específicos a lo largo de la cadena respiratoria hace intervenir a los intermediarios hipotéticos transitorios ricos en energía (A y B sobre el esquema, uno en estado reducido, el otro oxidado). La última reacción que desemboca en el ATP puede ser asimilada a la inversa de una reacción ATPásica de hidrólisis del ATP en ADP + fosfato inorgánico.

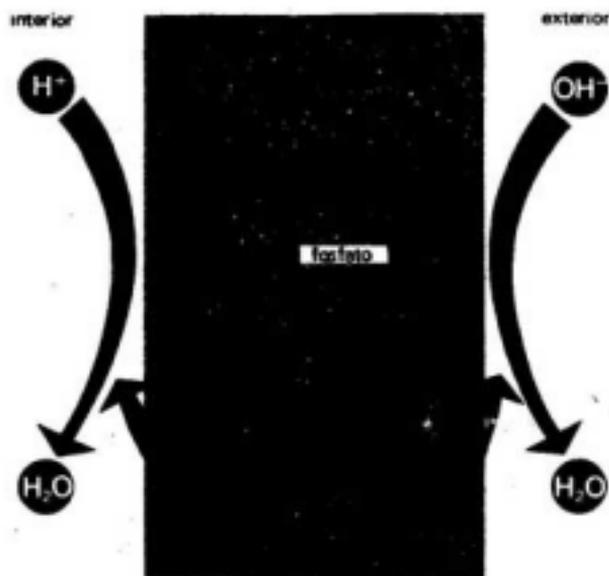


Figura 7B. En la teoría quimio-osmótica, esta reacción que conduce a una eliminación de agua, provocaría un gradiente de iones OH^- y H^+ de una parte y de otra de la membrana. Este gradiente sería capaz de generar enlaces ricos en energía.

teóricamente necesario para responder de las cantidades de ATP realmente sintetizadas por las mitocondrias, debería ser del orden de 4 a 5 unidades pH, lo que está lejos de la realidad. No es, pues, improbable que el gradiente de pH que se conserva durante el transporte de electrones no sea más que la consecuencia de la hidrólisis de uno de los intermediarios ($X \sim I$) de la teoría química. El mérito esencial de la teoría quimio-osmótica fue sin lugar a dudas el forzar a los investigadores a considerar la implicación de las asociaciones de enzimas con los compuestos estructurales de la membrana en el mecanismo de las fosforilaciones oxidativas.

D. E. Green propuso, en 1967, una tercera teoría. Está fundada en esta observación: cambios conformacionales de gran amplitud se producen paralelamente al desarrollo de los procesos energéticos de la mitocondria. Este fenómeno condujo a Green a imaginar la existencia de una unidad membranosa repetitiva tridimensional que sería la unidad molecular de la transducción energética. La transferencia de electrones desembocaría en la transducción del potencial de oxidorreducción en energía conformacional utilizable, entre otras cosas, para la síntesis de ATP.

3. La mitocondria y su medio ambiente

Hasta ahora hemos descrito las mitocondrias como centrales energéticas de la célula. Si las consideramos ahora en su medio natural, vemos la importancia del papel jugado por los fenómenos de permeabilidad membranosa, por una parte, en el transporte de los iones y de los sustratos y, por otra parte, como generadores del poder reductor necesario para el cumplimiento de las principales reacciones metabólicas celulares. Ya hemos indicado las propiedades de permeabilidad específica de las dos membranas mitocondriales respecto a moléculas e iones. Y la necesidad, para un sustrato que debe reaccionar con una enzima situada en la matriz mitocondrial, de penetrar previamente a través de las membranas externas, después en las internas. Si, en lo que concierne a la membrana externa, no hay problema de permeabilidad, no es lo mismo con la membrana interna, relativamente impermeable a las pequeñas moléculas y a los iones. También, para que los sustratos puedan penetrar, es necesario admitir que existen sistemas de transporte específicos en esta membrana. Frecuentemente, la utilización de estos sistemas de transporte, por los sustratos o los iones, no es posible más que gracias a la presencia de ciertos activadores específicos. Tales consideraciones sobre la permeabilidad de la membrana

se aplican también, por ejemplo, a la accesibilidad de las deshidrogenasas a compuestos tan esenciales como sus cofactores, el NAD^+ y el NADP^+

La membrana de las mitocondrias

Centrales energéticas de la célula, las mitocondrias juegan también para ella el papel de generadoras del poder reductor necesario para el cumplimiento de sus actividades metabólicas. Estas reacciones de cambio entre las mitocondrias y su ambiente celular, el citoplasma, se hacen a nivel de su membrana por mecanismos de transferencia específicos y de permeabilidad selectiva.

Los métodos de estudio de las propiedades de permeabilidad de las membranas mitocondriales consisten primeramente en determinar los diferentes "espacios" de las mitocondrias y en comparar la penetración en estos espacios de los compuestos a estudiar, en relación a diferentes marcadores. Entre estos últimos, figuran compuestos de alto peso molecular, poliglucosa marcada con carbono-14 o bien seroalbúmina marcada con yodo-131. Sirven para determinar el espacio extramitocondrial, es decir el volumen de agua que, en el precipitado de mitocondrias estudiadas, está situado en el exterior de los orgánulos. La sacarosa se utiliza para medir la suma del espacio extramitocondrial y el espacio comprendido entre las dos membranas, externa e interna, de la misma manera que, probablemente, el espacio *intra cristae*. El conjunto de estos volúmenes, llamado "espacio-sacarosa", representa aproximadamente el 60% del agua del precipitado mitocondrial. Las sustancias que penetran a través de la membrana interna llegan hasta un volumen superior a este espacio. Para medir exactamente la penetración de una sustancia dada, se debe suprimir, gracias a la utilización de inhibidores apropiados, el metabolismo de esta sustancia en el interior de las mitocondrias. Por ejemplo, para el cetoglutarato se utiliza como inhibidor el arseniato; para el citrato, el fluorocitrato. Se utilizan paralelamente los inhibidores de las oxidaciones: rotenona o antimicina. En efecto, el metabolismo de las mitocondrias debe ser totalmente detenido si se quieren obtener resultados valederos. Se debe tener en cuenta por otra parte que toda penetración, por ejemplo, la de un anión, implica bien la penetración simultánea de un catión, bien el intercambio con otro anión, a fin de que la neutralidad eléctrica del sistema se mantenga.

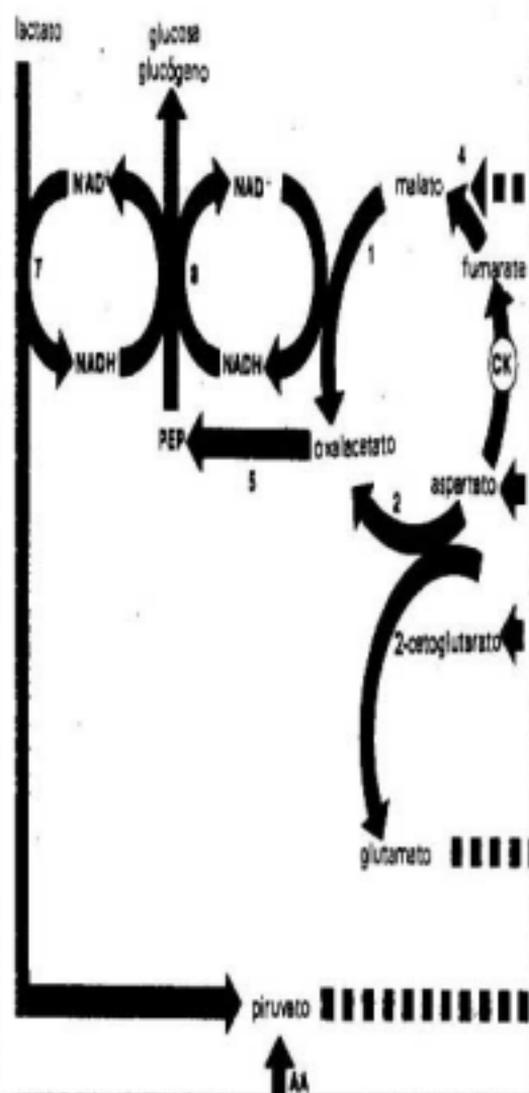
También se utilizan otras técnicas. La determinación de las propiedades osmóticas de las mitocondrias se traduce por una hinchazón o, por el

contrario, una contracción de las partículas, fácilmente observables al espectrofotómetro. Para estudiar en particular la penetración de los sustratos aniónicos, el método más favorable consiste en medir las modificaciones del estado oxidorreductor de los NAD intramitocondriales. Esto se realiza gracias a la técnica de espectrofotometría a doble haz de Chance o bien mediante análisis fluorimétrico, y teniéndose entonces en cuenta el hecho de que las principales enzimas mitocondriales están situadas en la matriz y que, para que la reacción pueda producirse, el sustrato debe antes penetrar a través de la membrana interna.

Cuadro 1. Los sistemas de transporte en la mitocondria.

SUSTANCIAS	COFACTORES	INHIBIDORES
nucleótidos ATP/ADP	Mg ²⁺	antibióticos
ácidos grasos triacilglicerol	ácidos grasos	metformina
ácidos oxalacético isovalerato	ácidos grasos malato	trifluoroacetato
glucosaminas	ácidos grasos	ácido salicílico ácido salicílico ácido salicílico
ácido fólico	glucosaminas	

CITOPLASMA



MITOCONDRIA

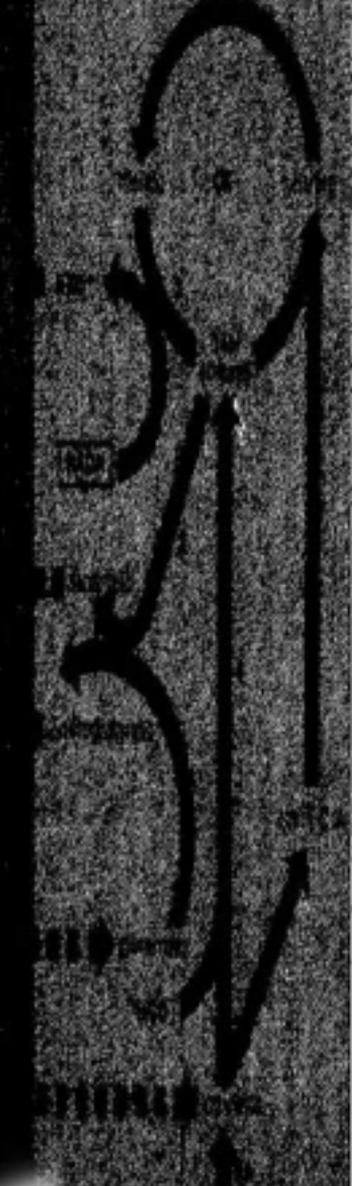


Figura 8. Cuando la mitocondria comunica con el citoplasma. Las oxidaciones celulares que representan el fin de la degradación de los alimentos (catabolismo) se efectúan íntegramente en las mitocondrias. Por el contrario, la mayor parte de las reacciones de biosíntesis que regeneran las reservas energéticas de la célula (gluconeogénesis en particular, que regenera glucosa y glucógeno) se efectúan en el citoplasma. El acoplamiento de estas dos operaciones se realiza gracias a la transferencia de *equivalentes reductores* provenientes de las mitocondrias. El mecanismo de esta transferencia se puede explicar mediante este esquema hipotético que tiene en cuenta la impermeabilidad de las mitocondrias frente al NADH y al oxalacetato. En la mitocondria, el oxalacetato, en presencia del NADH, forma malato que puede atravesar la membrana y regenerar en el citoplasma a la vez oxalacetato y NADH. Puede también por dos transaminaciones sucesivas, una en la mitocondria y otra en el citoplasma, formar aspartato que liberará oxalacetato en el exterior de las mitocondrias. (Según G.D. Greville, *Citric Acid Cycle*, J.M. Lowenstein ed., Dekker, 1969).

El conjunto de estas técnicas ha permitido un excelente conocimiento del movimiento de los iones en las mitocondrias aisladas, así como el desarrollo de interesantísimos sistemas de estudio: las membranas artificiales, ya de naturaleza fosfolipídica, ya de naturaleza proteica. Así es como fue descubierta y experimentada la acción de cierto número de antibióticos sobre el movimiento de los cationes a través de las membranas. Estos antibióticos (valinomicina o gramicidina) tienen una estructura química extremadamente interesante; son polipéptidos cíclicos neutros, su perímetro es hidrófobo y su parte central hidrófila.

Gracias a estas técnicas, Chappell y col.³ en Inglaterra, y Vignais y col.⁴ en Francia, han podido postular la existencia de sistemas de transporte específicos para cada tipo de sustancia penetrante, como indicamos en el cuadro 1.

La existencia de tales sistemas de transporte en las mitocondrias no es en absoluto contradictoria con las diversas hipótesis consideradas para dar cuenta de los mecanismos responsables de la síntesis del ATP en las mitocondrias. La teoría quimio-osmótica, por ejemplo, propone la existencia, a través de la membrana mitocondrial interna, de un potencial que es utilizado para sintetizar el ATP. Para que tal potencial exista, esto implica el hecho de que la membrana no pueda ser libremente permeable a los aniones y a los cationes. Por otra parte, estos sistemas de permeabilidad selectiva juegan un papel importantísimo en las relaciones metabólicas que existen entre las mitocondrias y el resto de las células. Si se trata de

3. J.B. Chappell y Haarthoff, en *Biochemistry of mitochondria* (E.C. Slater, Z. Kunjaga y L. Wojtczac, etc.), Academic Press, Londres, p. 75, 1967.

4. E.D. Dué y P.V. Vignais, *J. Biol. Chem.*, 244, 3920 y 3932, 1969.

mitocondrias de músculo, dichas relaciones son muy sencillas, pues estos tejidos oxidan principalmente el piruvato y el glicerol-fosfato, y la sola función real de tales mitocondrias es la síntesis del ATP. En este caso no cabe encontrar sistemas transportadores de aniones. Es muy distinto cuando se consideran las mitocondrias hepáticas, pues su papel metabólico es importantísimo, y el papel de los sistemas transportadores se considera determinante. Uno de los aspectos primordiales de estas relaciones entre mitocondrias y citoplasma es sin duda la transferencia de equivalentes reductores entre ambos ambientes o, en otros términos, la propiedad de las mitocondrias de generar una actividad reductora. Una de las características de organización celular en el hígado y otros tejidos es, indudablemente, la impermeabilidad de la membrana externa de las mitocondrias a los nucleótidos de nicotinamida (NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH), primeros aceptores de electrones de la cadena respiratoria y coenzimas de la mayor parte de las enzimas solubles del ciclo de Krebs. Esto impide a las mitocondrias oxidar el NADH y convierte en necesaria la existencia de un sistema reversible de transferencia. Hay, por ejemplo, circunstancias fisiológicas en las que el NADH libre debe ser proporcionado rapidísimamente al citoplasma; es el caso de la gluconeogénesis a partir del piruvato en el hígado y el riñón, que resulta ser una continuación de reacciones metabólicas en sentido inverso de las de la glucólisis, y que lleva a una "resíntesis" de glucosa en lugar de a una degradación. En tal sistema, los equivalentes reductores no existen preformados en cantidad suficiente en el citoplasma, sino que provienen de la respiración del piruvato por las mitocondrias y deben ser transferidos al citoplasma. Para esto, existen numerosos esquemas que varían siguiendo la localización supuesta de las enzimas implicadas en este mecanismo. Todos tienen en cuenta la impermeabilidad aparente de las mitocondrias al oxalacetato (a excepción, quizás, de las mitocondrias de riñón, que oxidan perfectamente el oxalacetato) y hacen intervenir transferencias de malato o de aspartato, regenerándose el oxalacetato en el citoplasma gracias a reacciones de transaminación. Representamos aquí uno de los esquemas de transferencia de equivalentes reductores de una parte y otra de la membrana mitocondrial (fig. 8). Tales sistemas de permeabilidad selectiva intervienen también en el transcurso de otras actividades metabólicas (la lipogénesis, por ejemplo), y la regulación de tales fenómenos, en particular el control de la relación NAD^+/NADH en el citoplasma y las mitocondrias, se escapa aún a nuestros conocimientos. Nuestro trabajo personal en colaboración con el Dr. E. Kun, en los Estados Unidos, nos ha permitido

sacar a la luz la existencia de un factor citoplásmico capaz de actuar en concentraciones hormonales sobre fenómenos de permeabilidad mitocondrial, lo que quizás sea un peso hacia la mejor comprensión de esta regulación intercelular.

4. Antiguas bacterias

Nuestra exposición es evidentemente muy incompleta porque hemos limitado nuestra descripción a las mitocondrias de los animales superiores. Esto no debe hacernos olvidar que en las bacterias existen sistemas fosforilantes, y mitocondrias en las levaduras. Estas últimas han sido objeto de numerosos trabajos, y en el estudio de estos fenómenos se utilizaron técnicas genéticas, pues resultó que las mutaciones pueden provocar diversas modificaciones de la cadena respiratoria en orgánulos de origen mutante, permitiendo así abordar las fosforilaciones oxidativas por una vía totalmente diferente y muy original⁵.

He descrito sucesivamente la mitocondria, su organización, sus funciones; la hemos situado en su medio celular y visto qué papel ejercía en él, así como las relaciones que existían entre sus diversos compartimentos y el citoplasma. Querría, para terminar, indicar brevemente los problemas que plantean el origen y la biosíntesis de estos orgánulos: después de las investigaciones de Altman desde 1918, estos problemas no han dejado, en efecto, de intrigar a numerosos biólogos, citólogos y genetistas. Lehninger clasifica las teorías concernientes a la biogénesis de las mitocondrias en tres categorías:

- * una síntesis *de novo* a partir de elementos preexistentes;
- * su formación por invaginación de estructuras membranosas celulares;
- * su crecimiento y su división a partir de entidades mitocondriales preexistentes.

Si es posible reunir para cada una de las alternativas un haz de argumentos convincentes, parece que actualmente se tiende a considerar la formación de mitocondrias desde un punto de vista estrictamente evolutivo. Las mitocondrias no existen, en efecto, más que en las células

5. D. Coen, J. Deutsch, P. Netter, E. Petrochilo y P.P. Sloninski en *Control of organelle development*, Cambridge University Press, p. 499, 1970.

aerobias de los animales y de las plantas. En las bacterias, el sistema oxidofosforilante está enlazado a las estructuras y no existe en el estado de gránulos citoplásmicos. De ahí la idea, que reúne las importantes consideraciones de Altman, de considerar las mitocondrias de los animales superiores como la consecuencia genética de la existencia, desde el origen, de microorganismos parásitos del citoplasma de su célula huésped, que se convertirían en "residentes permanentes". Se formaría así una verdadera simbiosis metabólica. Se constata que las mitocondrias de las células primitivas poseen una capacidad de biosíntesis muy superior a la de las mitocondrias de células más evolucionadas. Las mitocondrias crecen y se desarrollan como una entidad aparte en la célula, y este crecimiento y desarrollo se hacen gracias a las enzimas y a los precursores de origen citoplásmico, pero también de origen exclusivamente mitocondrial. En efecto, las mitocondrias son capaces de sintetizar solas casi todos sus ácidos grasos, con una ayuda exterior muy modesta por parte del citoplasma. Conviene tener en cuenta sobre todo que las mitocondrias aisladas poseen a la vez un ADN (fig. 9) y un ARN característicos y son capaces de síntesis proteica independiente. Es difícil calcular la proporción



Figura 9. ¿Las mitocondrias son antiguas bacterias simbióticas de las células eucariotes? La presencia de un material genéticamente autónomo en estos orgánulos constituye un argumento importante a favor de esta teoría. Vemos aquí (flecha) el ADN de una mitocondria de levadura. (Cliché B.J. Stevens, x 80.000).

exacta de proteínas sintetizadas exclusivamente en el orgánulo, pero la cifra del 5 % parece aceptable. Las proteínas de la membrana y las proteínas de las *cristae* son sintetizadas en los ribosomas citoplásmicos y codificadas por genes del núcleo. Así, numerosas enzimas específicamente mitocondriales son sintetizadas en el exterior de las mitocondrias, pero no son realmente activas de un modo total más que integradas en las mitocondrias, y el ADN mitocondrial juega efectivamente un papel en esta integración, codificando las proteínas necesarias para tal mutación. Es chocante constatar cuantas similitudes existen entre mitocondrias y bacterias. Una de las más importantes concierne al mecanismo de su síntesis proteica que utiliza el mismo tipo de iniciador: el formil-metionil-tARN. Los ribosomas mitocondriales son de tipo bacteriano y su síntesis proteica está bloqueada por un inhibidor de la síntesis proteica bacteriana, el cloranfenicol, mientras que no se ve afectada por un inhibidor de ribosomas citoplásmicos de tejidos de animales superiores: la cicloheximida. Existen otras muchas semejanzas: semejanza de ribosomas, ausencia de colesterol, ADN libre y enlazado a proteínas básicas, etc.; todo ello crea una impresionante serie de argumentos en favor de la existencia de una indiscutible relación entre mitocondrias y bacterias, en un momento dado de la evolución, y la posibilidad de que una simbiosis, que se extiende, además, a los cloroplastos de las plantas verdes, hace el fenómeno más universal. Es un nuevo capítulo apasionante que se abre en esta larga búsqueda de los orígenes de la vida.

La Recherche, septiembre 1971

7. EL ORIGEN CELULAR DE LOS ANTICUERPOS

Alain Bussard

La inmunología es la ciencia que estudia las reacciones de defensa del organismo contra toda "agresión" exterior; más generalmente, que examina los mecanismos de "rechazo" que todo individuo pone en juego para eliminar una sustancia o un tejido extraños.

El estudio de este mecanismo en los animales superiores, y en particular en el hombre, ha permitido sacar a la luz, desde el principio de las investigaciones inmunológicas (fines del siglo XIX, Roux-Behring), la producción, en el suero de los individuos "inmunizados", por ejemplo, por una vacuna (o una enfermedad infecciosa natural), de sustancias especializadas: *los anticuerpos*. Estas sustancias son capaces de reaccionar con los microbios o las toxinas que han provocado su aparición —los *antígenos*— combinándose con ellos. Esta reacción es muy *específica*, en el sentido en que sólo el antígeno que inmuniza (la vacuna inyectada, por ejemplo), o un antígeno que posea una estructura muy próxima, será capaz de unirse al anticuerpo cuya aparición ha provocado, excluyendo cualquier otro microbio o toxina que pudiese encontrar.

El estudio de estos anticuerpos ha experimentado progresos considerables, particularmente en los diez últimos años, hasta el punto de que ahora se conoce no sólo su peso molecular y su estructura general, sino también literalmente su estructura química; tampoco examinaré el problema de su naturaleza, sino el planteado por su síntesis en el organismo.

Fuera de la síntesis de los anticuerpos que, parece, constituyen un patrimonio casi exclusivo de los vertebrados, existe en todos los animales un mecanismo de defensa contra las sustancias o los tejidos extraños que depende de la *inmunidad celular* y no parece poner en juego la síntesis de efectores específicos. Este rechazo implica un reconocimiento del "no-yo", pues, por lo general, su destrucción y su eliminación tienen lugar

gracias a mecanismos puramente celulares: células especializadas (pero no siempre, ya que en los organismos muy primitivos no existe prácticamente especialización relativa a los tejidos orgánicos) "reconocen" los tejidos extraños y después los destruyen.

Parece que este mecanismo sea absolutamente fundamental para el mantenimiento de la integridad individual de todo ser viviente, y se le ve manifestarse en organismos tan primitivos como los celentéreos¹ —los corales, por ejemplo— y los espongiarios.

En los vertebrados, la defensa por inmunidad celular y el procedimiento de síntesis de los anticuerpos coexisten, pero parece que este último mecanismo sea una adquisición evolutiva, un perfeccionamiento, en suma, del sistema de defensa que permite difundir rápidamente en todo el organismo medios de destrucción específicos de las células o de las sustancias extrañas invasoras. Este último aspecto de la defensa inmunitaria es el que voy a examinar, y muy particularmente el modo de producción de anticuerpos por las células especializadas.

Para conocer las células que producen los anticuerpos y los mecanismos implicados en sus síntesis, hay que poseer técnicas de detección y de dosificación en extremo sensibles y medios para mantener en vida, fuera del organismo, las células estudiadas.

Los métodos de la inmunología celular

Históricamente, los anticuerpos se dosificaron primero en la sangre: las técnicas clásicas de aglutinación (bacterias, glóbulos rojos, etc) o de precipitación (del antígeno por el anticuerpo) permiten dosificar hasta la milésima de miligramo de anticuerpos (10^{-6} g, o millonésima de gramo). Las técnicas más recientes, utilizando el efecto de inhibición de los virus o de las enzimas por los anticuerpos, permiten dosificar cantidades 100 veces más pequeñas (10^{-8} g). Finalmente el empleo de isótopos radiactivos para marcar los antígenos que enseguida son precipitados (insolubilizados) por el anticuerpo (técnica llamada de los radio-inmuno-ensayos) lleva el límite de la detección al nanogramo (10^{-9} g, o mil millonésima parte de gramo).

A la microdosificación de los anticuerpos se añade la individualización de las células productoras con las técnicas de las "rosetas" y de las "placas". En efecto, si se quiere poder individualizar y después enumerar las células productoras de anticuerpos, en una población en cultivo, ¡hay

1. J. Theodor, *Nature*, 227, 609, 1971.

que poder detectar la producción de una célula aislada! Ahora bien, se puede considerar que una célula especializada produce del orden de una milésima de nanogramo de anticuerpos por hora (10^{-12} g, o picogramo), lo que representa en anticuerpos llamados macroglobulinas (o IgM), de peso molecular 900.000, alrededor de 600.000 moléculas (¡una síntesis de 200 moléculas por segundo!).

Para detectar cantidades ponderablemente escasas, ha habido que poner a punto técnicas de alguna manera amplificadoras que permitieran visualizar la existencia de algunas moléculas de anticuerpos (del orden de un millar) gracias a un efecto de estas moléculas sobre partículas infinitamente más grandes: los glóbulos rojos. Se han inventado dos técnicas, hace una decena de años, utilizando bien la aglutinación de glóbulos rojos alrededor de las células productoras de anticuerpos [leucocitos] (técnicas de las "rosetas": Biozzi-Zaalberg)² o bien la lisis de glóbulos rojos por estas mismas células (técnica de las "placas": Jerne-Ingraham y Bussard)³. En esta última técnica, los glóbulos rojos están mezclados con la población de células productoras de anticuerpos (en la proporción de alrededor de 1 leucocito por 100 glóbulos rojos) y en general incorporados en un medio semisólido (gelosa-metil celulosa). Si los leucocitos provienen de un animal que ha sido "inmunizado" por los glóbulos rojos (por una inyección de glóbulos rojos practicada cuatro días antes de la toma de leucocitos) se ven, tras una hora de incubación de la mezcla a 37°, desarrollándose "placas" de lisis alrededor de ciertos leucocitos que producen los anticuerpos "antiglóbulos rojos" que provocan la lisis (por perforación de la membrana de los glóbulos) de estos hematies. La placa de lisis aparece como un "agujero" negro en medio de una alfombra piquetada de puntos brillantes formados por glóbulos rojos intactos en las regiones desprovistas de leucocitos segregadores de anticuerpos. Esta técnica es de gran sensibilidad (detecta algunos millares de moléculas de anticuerpos) y también de gran poder de selección (puede enumerar algunas células activas por millones de células examinadas).

Después de su puesta a punto inicial en 1963, el método de las placas ha tenido numerosas modificaciones y extensiones que han permitido aumentar su sensibilidad, simplificar su empleo y hacer más universal su campo de aplicación a todos los antígenos deseados: proteínas, azúcares,

2. G. Biozzi y cols., *Ann. Inst. Pasteur*, 110, 1966; O. Zaalberg, *Nature*, 202, 1231, 1964.
3. N. Jerne y cols., *Cell Bound Antibodies*, Wistar Inst. Press, Filadelfia, 1963; J. Ingraham y A. Bussard, *J. Ex. Med.*, 119, 669, 1964.

virus, sustancias químicas sencillas, y a todos los tipos de anticuerpos producidos: IgG, IgA, etc. (ver fig. 2).

La técnica de las placas y la de las rosetas han provocado progresos considerables en la inmunología celular durante estos últimos años. Han permitido conocer el tipo de las células implicadas en la síntesis de los anticuerpos, su número, dilucidar en parte la cinética de la respuesta inmunitaria, los mecanismos bioquímicos implicados en la biosíntesis de los anticuerpos y las interacciones entre las células que conducen a esta biosíntesis.

Cultivos de tejidos *in vitro* e *in vivo*

No obstante, la posesión de métodos sencillos y muy sensibles de detección y de enumeración de las células productoras de anticuerpos no era suficiente para cubrir nuestras necesidades: el elevado número de parámetros que intervienen en la respuesta inmunitaria de un animal—desde la inyección de antígeno hasta la producción, cuatro días más tarde, de anticuerpos detectables en la sangre—excluía el análisis. Habría que introducir métodos que permitieran seguir todas o parte de las etapas implicadas con los tejidos o las células aisladas del organismo. El desarrollo considerable desde 1950 de los procedimientos de cultivos de tejidos *in vitro* (es decir en tubos de ensayo o "cajas" de cultivo) ha proporcionado a los inmunólogos el medio de conservar, o de cultivar fuera del organismo, tejidos o células inmunológicamente competentes, durante días o incluso semanas. Quedaba una última etapa por franquear: la que consistía en poder *estimular* la síntesis de los anticuerpos totalmente *in vitro*, a partir de las células de un animal *nuevo*, es decir, de un animal que no haya tenido contacto con este antígeno en toda su vida. Esto se había hecho con fragmentos de rata o de ganglios linfáticos desde 1912⁴, pero, en esta época, los métodos de cultivo de tejidos estaban demasiado poco evolucionados y eran demasiado delicados como para que estas tentativas consiguiesen un gran auge. Hasta 1966 Auerbach y sus colaboradores⁵ no establecieron con éxito un método sencillo de cultivo de fragmentos de

4. H. Ludke, *Klin. Wschr.*, 22, 1034, 1912; A. Carrel y col., *J. Ex. Med.*, 15, 287, 1912.

5. R. Auerbach y cols., *Exp. Cell. Res.*, 42, 31, 1966.



Figura 1. Ciertos animales son incapaces de experimentar una reacción inmunológica frente a sustancias extrañas. Es el caso de los ratones "desnudos", que están prácticamente desprovistos de timo y por consiguiente son incapaces de rechazar un injerto que provenga de otra especie. La que se ve aquí ha recibido un injerto de piel de polluelo que, tres semanas y media después de la operación, sobrevivía perfectamente sobre el animal injertado. (Cliché Jorgen Rygaard, Kommunehospitalet, Copenhague, Dinamarca).

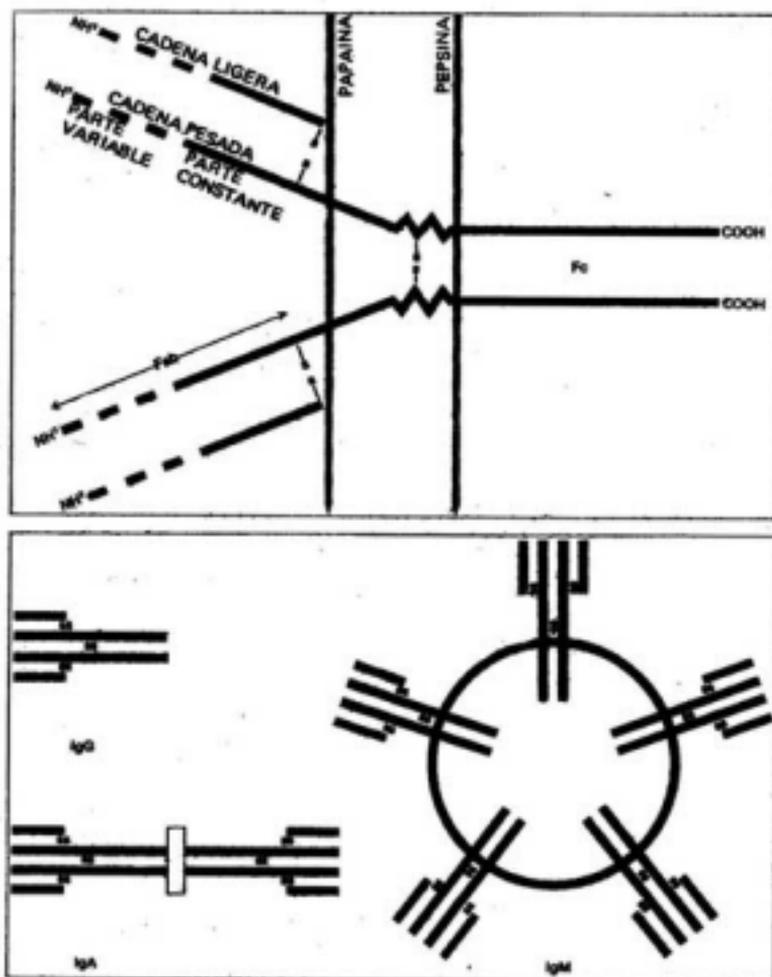


Figura 2. Esquema de las principales inmunoglobulinas. Los anticuerpos son proteínas llamadas inmunoglobulinas o Ig. Se conocen cinco clases principales de las cuales las mejor conocidas son las IgG, las IgM y las IgA. Su peso molecular se extiende de 160.000 para las IgG a 900.000 para las IgM. La digestión cuidadosa por las enzimas (papaina, tripsina), la reducción y el análisis de las secuencias han demostrado que todas llevan dos tipos de cadenas polipeptídicas: ligera (210 aminoácidos), o L, común a todas las clases de Ig (K o λ) y una cadena pesada (420), o H, específicas de cada clase de IgG (γ , μ , α ...). Además, cada una de estas cadenas lleva una parte variable (V) de 107 aminoácidos a partir de NH_2 terminal y una parte constante (C) para las familias de Ig en un mismo individuo.

bazo de anfibio, de pollo o de mamífero que permitiese una estimulación antigénica totalmente *in vitro*.

Por último, Mishell y Dutton⁶ con células esplénicas disociadas del bazo de un ratón no inmunizado, consiguieron estimular esta población celular *in vitro* y examinar la producción de anticuerpos, al nivel de células individuales, por el método de las placas.

Como siempre en la ciencia, era necesario esperar que se alcanzara cierto nivel tecnológico y que se pudieran combinar técnicas diferentes para poder responder a cuestiones planteadas desde hacía mucho tiempo, pero que habían quedado sin respuesta por falta de un aparato técnico adecuado.

Queda por mencionar un último método que, sin ser quizás tan esencial para la inmunología celular como las técnicas ya mencionadas, no por ello ha permitido menos progresos importantes: la de las *transferencias celulares*. En efecto, hay numerosos casos en los que es difícil o imposible llevar a cabo el cultivo de ciertas células *in vitro*, sobre todo si se parte de un pequeño número de células (menos de $5 \cdot 10^5$ /ml). Por el contrario, si se utilizan como "receptor" células de un animal isogénico de la misma especie y de la misma "línea" que la del donante, y a condición de que este receptor haya sido previamente irradiado masivamente con rayos X de manera que quede eliminada su participación personal en la respuesta inmunitaria, se puede obtener un verdadero cultivo *in vitro* de las células transferidas (ver fig. 3). Este método es muy utilizado hoy y ha permitido obtener muchas informaciones sobre numerosos aspectos celulares de la respuesta inmunitaria, en particular sobre la cooperación entre diferentes tipos de células que se desarrolla en la producción de anticuerpos.

6. R. Mishell y R. Dutton, *J. Exp. Med.*, 126, 423, 1967.

Figura 3. Esquema de las transferencias celulares: se toma el bazo de un ratón inmunizado (mediante glóbulos rojos, por ejemplo) se disocian las células y después se inyectan en la vena de un ratón previamente irradiado con rayos X (a fin de impedirle rechazar estas células extrañas). Algunos días más tarde, se toma a su vez el bazo de este ratón, se preparan como antes sus células linfoides y se las incorpora en un gel revelador (que contenga glóbulos rojos) a fin de someterlas al test de la "hemólisis local". Se puede también enumerar e identificar las células productoras de anticuerpos que se han desarrollado en el bazo del ratón receptor.

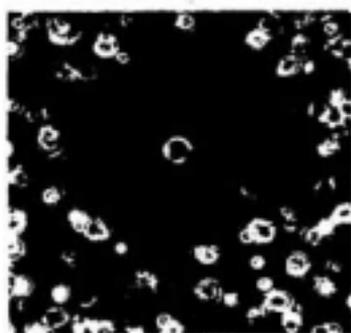
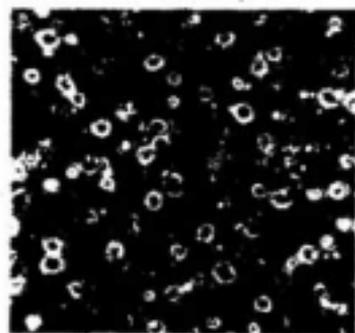
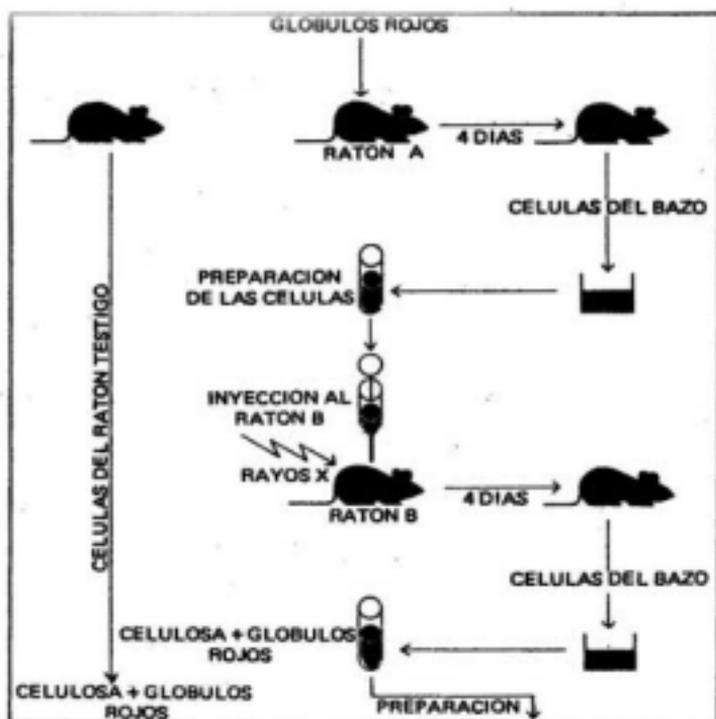


Figura 3

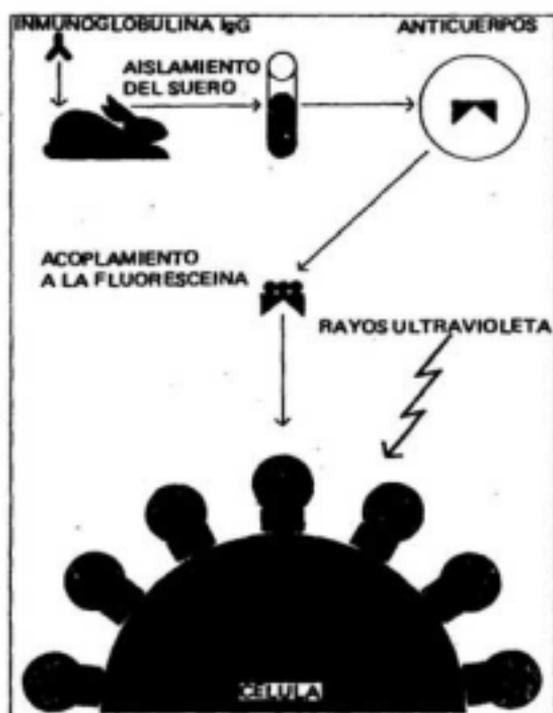


Figura 4

Microscopia y marcadores específicos

En 1942, A. Coons⁷, en Estados Unidos, puso a punto una técnica para identificar la presencia de sustancias específicas —inmunoglobulinas por ejemplo— en la superficie de las células productoras. Este método recurría a la reacción de anticuerpos específicos, previamente obtenidos en un animal diferente al que se estudia (por ejemplo, conejo inmunizado por suero de ratón), con las células que producen la sustancia estudiada.

Los anticuerpos están *marcados* por apareamiento químico con una molécula fluorescente (fluorocromo). Se incuban los cortes histológicos o los frotis celulares con estos anticuerpos marcados de manera que se obtenga una reacción antígeno-anticuerpo que permita la fijación fuerte del fluorocromo sobre las sustancias estudiadas. Se puede también ver al microscopio cómo las superficies de las células que poseen la sustancia específica se iluminan brillantemente si se las irradia con una luz cuya longitud de onda corresponda a la banda de excitación del fluorocromo utilizado (ver fig. 4).

Este método, ampliamente empleado desde hace veinte años, ha conseguido progresos considerables en nuestros conocimientos sobre el tipo de células que poseen en superficie anticuerpos de tal o cual clase, sobre la disposición de estos anticuerpos en la membrana, etc.

Otro medio de detectar las inmunoglobulinas sobre la membrana o en el citoplasma de los inmunocitos establece el empleo de enzimas unidas a anticuerpos (Avraméas)⁸. Se pueden identificar las células que producen estas inmunoglobulinas como con la técnica de inmunofluorescencia, pero utilizando esta vez las reacciones específicas de las enzimas acopladas. Estas técnicas de detección de las inmunoglobulinas que utilizan anti-

7. A.H. Coons y col., *J. Immunol.*, 45, 159, 1942.

8. S. Avraméas, *Int. Rev. Cytol.*, 27, 349, 1970.

Figura 4. Esquema de la inmunofluorescencia: se puede detectar la presencia de las inmunoglobulinas (Ig) en la superficie o en el interior de las células linfoides utilizando la técnica de "inmunofluorescencia". En un primer tiempo, se prepara un anticuerpo de conejo (por ejemplo) contra las Ig estudiadas (de ratón, por ejemplo), estas inmunoglobulinas sirven entonces de antígeno. El anticuerpo de conejo, que se obtiene en el suero del animal inmunizado, es purificado y después "marcado" mediante una sustancia fluorescente que se le añade por vía química. Para descubrir la presencia de las Ig, se incuban las células o los cortes de tejido estudiados con el anticuerpo marcado, se lava la preparación y después se examina al microscopio con luz ultravioleta. Las células que contienen las Ig se iluminarán entonces brillantemente.

Anticuerpos marcados han podido también ser aplicadas al examen de las ultraestructuras celulares gracias a la microscopía electrónica. Así es como se puede, marcando los anticuerpos específicos ya sea con la ferritina ya sea con peroxidasa, detectar al nivel de los orgánulos celulares, es decir, en una escala del orden de unos cientos de angströms, la presencia de inmunoglobulinas. Se ha podido, por ejemplo, en la respuesta secundaria, seguir una secuencia de acontecimientos que tienen lugar en el transcurso de la producción de anticuerpos y mostrar que éstos aparecen primero en el espacio perinuclear e inmediatamente después al nivel de los ribosomas que tapizan el endotelio ergastoplásmico (fig. 5).

Iniciación de la síntesis de anticuerpos

Es necesario subrayar primero que todas las experiencias llevadas a cabo hasta hoy permiten pensar que los procesos bioquímicos que conducen a la síntesis de anticuerpos no difieren sensiblemente de los que han sido puestos al día por la biología molecular, en particular respecto al modelo de la síntesis de las enzimas por las bacterias (transcripción de las informaciones de estructura llevadas por el DNA en el RNA mensajero, traducción de información del mRNA en las cadenas peptídicas al nivel de los ribosomas). Sin embargo, han de considerarse modalidades especiales que permitan la formación del producto acabado —la molécula de anticuerpo—, ya que se trata de un dímero particular que lleva dos tipos de cadenas peptídicas (L y H) asociadas dos a dos, cada una formada por separado sobre un ribosoma que lee un mRNA dado. Hay, pues, que imaginar un mecanismo especial para asociar específicamente, dos a dos, estos elementos H y L que están enlazados entre sí por puentes disulfuro creados entre dos aminoácidos azufrados vecinos, de una cadena a otra.

Los problemas fundamentales propios en la síntesis de los anticuerpos me parece que son los siguientes: ¿Cómo inicia el antígeno esta síntesis? ¿Cuáles son las células implicadas en la estimulación antigénica y en la producción de anticuerpos? ¿Qué interacciones intervienen entre estas células? ¿Qué es lo que convierte una sustancia en inmunogénica, es decir, susceptible de iniciar la respuesta inmunitaria? Finalmente, ¿cómo darse cuenta de la extraordinaria diversidad de los anticuerpos?

El problema principal que toda teoría debe resolver concierne a la notable complementariedad del anticuerpo respecto al antígeno (la estructura del anticuerpo hace que se adapte con gran precisión al antígeno).



Figura 5A. Un hemocitoblasto típico en el que el anticuerpo está presente en el espacio perinuclear (visible con forma de orla negra bordeando el núcleo), en dos segmentos de ergastoplasma (flechas) y en el aparato de Golgi (ga). Coloración específica por la peroxidasa que sirve de marcador a los anticuerpos específicos formados por la célula (aumento x 10.000).

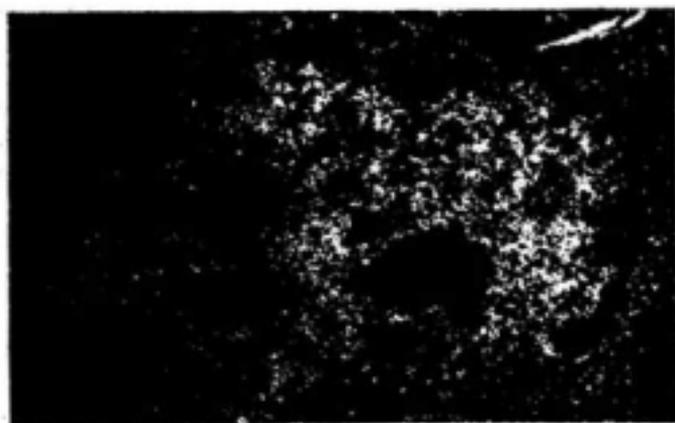


Figura 5B. Un estadio más avanzado de la diferenciación (plasmoblasto) en el que el retículo endoplásmico está más desarrollado, pero todavía extendido, y lleno de anticuerpos (aumento x 10.000). (Cliché M.E. Avramías).

Durante largo tiempo se ha creído que la síntesis de los anticuerpos la gobernaba un mecanismo *adaptativo*: toda célula linfocítica madura (es decir, una célula del sistema linfático, principalmente del bazo o de los ganglios linfáticos) convenientemente estimulada por el antígeno fabricaba una molécula de anticuerpo complementaria de este antígeno. Diversas hipótesis se proponían para dar cuenta de la síntesis de esta molécula de anticuerpo, la mayor parte haciendo jugar al antígeno un papel de "matriz" sobre la que se "moldeaba" la molécula de anticuerpo.

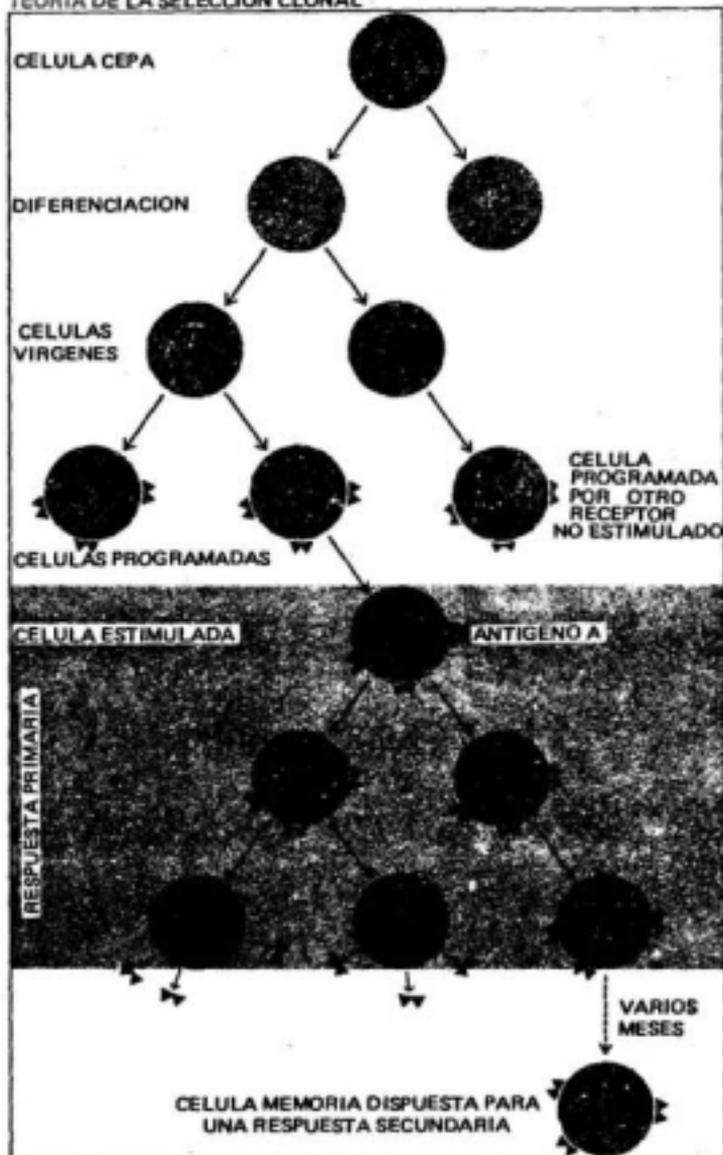
Hay que decir que, desde los años 50, este proceso de síntesis adaptativa parecía cada vez menos de acuerdo con todo lo que se descubría sobre los mecanismos biosintéticos de las proteínas, en particular en las bacterias. Cuando se llegó al convencimiento de que una proteína no dirigía la síntesis de otra proteína, hubo que admitir que, para la síntesis de los anticuerpos en las células de vertebrados, como para la de las enzimas en las bacterias, no había síntesis "adaptativa" del anticuerpo gobernada por el antígeno, sino una *selección* de un mecanismo innato en la célula (es decir, preexistente) por parte del antígeno. Entonces Burnet y Lederberg propusieron la teoría de la selección clonal⁹.

Según esta teoría, existen en el seno de la población de las células linfocíticas de un animal adulto *clones celulares*, es decir, descendencias de células homogéneas; cada descendencia deriva, por divisiones sucesivas, de una sola célula primordial. Todas las células de este clon tienen la propiedad de "reconocer" un solo antígeno existente en la naturaleza. Este reconocimiento se efectúa gracias a la existencia, en la superficie de la célula, de "receptores" específicos del antígeno para el que esta célula está especializada. Cuando las células competentes han reaccionado, se inicia un proceso de división celular, que tiene por efecto multiplicar estas células, lo que hace que, algunos días después de la introducción del antígeno en el organismo (4, por ejemplo), el número de células competentes se haya multiplicado por 4.000 aproximadamente. Entre estas células que se dividen, algunas sintetizarán y segregarán en la sangre el anticuerpo correspondiente al inmunógeno para el que ellas disponen —en su material genético (ADN)— de la información estructural necesaria para la síntesis de la proteína anticuerpo (ver fig. 6).

Así el papel del antígeno es, en esta teoría, muy reducido: toda la información necesaria para la síntesis del anticuerpo *preexiste* en la célula competente, y el antígeno no hace más que iniciar el proceso de multiplicación celular y de síntesis consecutiva de anticuerpo.

9. M. Burnet, *Austr. J. Sci.*, 20, 67, 1957; J. Lederberg, *Science*, 129, 1649, 1959.

TEORIA DE LA SELECCION CLONAL



En estas condiciones, una célula dada sólo puede reaccionar, evidentemente, con un solo antígeno, que la *selecciona* entre millones de otras células; ulteriormente, esta célula no podrá sintetizar más que un único tipo de anticuerpo.

Se puede decir que este modelo es, con algunas variantes, aceptado por la mayor parte de los inmunólogos. Veremos al final de este artículo si puede ser admitido sin reserva o, como yo creo, si persisten importantes dificultades experimentales en su adopción definitiva.

Una vez admitido este principio general de selección clonal, se pueden considerar modalidades diferentes para darse cuenta de la existencia, en el animal inmunológicamente competente, de clones celulares poseedores, en su conjunto, de todas las informaciones genéticas necesarias para responder a toda estimulación antigénica posible. ¡Se trata, en suma, para el animal, de ser capaz de *prever lo inesperado!* Previsión que será desestimada en una proporción superior al 999 por 1000, puesto que en el transcurso de su vida el animal no encontrará más que algunas centenas de entre los millones de antígenos para los que posee un programa genético preestablecido de respuesta.

Las dos subhipótesis selectivas actualmente más de moda son las siguientes:

o bien todas las informaciones necesarias para asegurar la totalidad de la competencia inmunológica en un animal adulto existen en la célula primordial: el huevo (*teoría germinal*);

o bien las células adquirirán al azar, en el transcurso de la maduración embrionaria, por mutación, la información que hará al clon que deriva de esta célula mutada competente para reaccionar con un antígeno dado y, por consiguiente, para producir el anticuerpo complementario (*teoría de las mutaciones somáticas*).

Figura 6. Según la hipótesis de la selección clonal, las células linfoides primordiales están diferenciadas desde el punto de vista inmunológico. En cierta época, estas células se hacen competentes: cada célula adquiere un programa particular (un receptor complementario de un antígeno). Si un antígeno entra en contacto con la célula que lleva el receptor adecuado, esta célula se dividirá, dando nacimiento a una descendencia (un "clon") de células parecidas y dotadas todas del receptor específico. Algunas de estas células segregan el anticuerpo específico del antígeno (anticuerpo que quizás sea el receptor mismo) y capaz de combinarse con él. Otras quedarán quiescentes, constituyendo una población de células "memoria" susceptibles de reactivarse en todo nuevo contacto con el antígeno específico (reacción secundaria).

Mientras que la primera hipótesis presenta un aspecto muy conforme a la genética clásica, la segunda introduce una noción totalmente deshabitual en genética: la aparición de una información nueva por mutaciones somáticas muy frecuentes —surgidas en las células de un mismo individuo y esto de manera constante. En un sentido se podría decir que se trata de una teoría "neo-genética". Ninguna de estas dos hipótesis se ha establecido definitivamente hasta ahora, pues cada una de ellas plantea objeciones experimentales muy serias.

El mecanismo de selección invocado por las dos hipótesis es evidentemente muy distinto. Mientras que en el caso de la hipótesis germinal la selección se efectúa en el transcurso de millones de años que han sido necesarios para la evolución de las especies, para la teoría de las mutaciones somáticas, la selección se efectúa no sobre los individuos sino sobre las células. Como un autor americano ha dicho, la teoría germinal implica, como toda teoría selectiva clásica, un enorme gasto de individuos en beneficio de los mejor dispuestos. Por el contrario, para la teoría de las mutaciones somáticas, la selección de clones competentes comportaría un enorme gasto de células en el seno de un mismo individuo.

Cualquiera que sea el mecanismo invocado para dar cuenta de la aparición de la diversidad de codificación de los anticuerpos, las dos hipótesis citadas anteriormente coinciden en admitir que el animal adulto plenamente competente lleva consigo clones celulares que serán seleccionados para reaccionar frente a un antígeno introducido en el organismo, y que a un *antígeno* corresponde un clon.

Las células implicadas en la producción de anticuerpos

Se considera actualmente que tres tipos de células participan en las diferentes fases que, después de la introducción de la sustancia extraña antigenética, desembocan en la producción de anticuerpos.

● *El macrófago* es la primera célula que entra en acción cuando un agente extraño, por ejemplo, un microbio, penetra en el organismo (fig. 7A). Este leucocito, que se encuentra en el bazo, la cavidad peritoneal, los pulmones y en general en todas las puertas de entrada del individuo, es una célula bastante grande (20-25 μ), capaz de movimientos rápidos, que se desplaza continuamente por el cuerpo y se dirige hacia los lugares de invasión microbiana. Tiene la notable propiedad de reconocer las células o sustancias extrañas, al igual que a las células envejecidas del organismo, de ingerirlas y de destruirlas, para que sean eliminadas ulteriormente.



Figura 7. Microscopía electrónica de células linfoides de rata. A) Macrófago en el seno de un islote linfo-macrofágico que proviene de una suspensión de células de bazo de ratón C 57 B1 de 2 meses de edad (aumento x 2.400). B) Plasmocito de bazo de ratón CBA de 2 meses de edad (aumento x 6.000). C) Linfocito de bazo de ratón C 57 B1 de 2 meses de edad (aumento x 6.000).

Cuando estos antígenos extraños han sido modificados por la digestión que ha tenido lugar en el interior de los macrófagos, se produce una transferencia del macrófago a la célula productora de anticuerpos, llamada célula B (fig. 7B).

No se sabe actualmente claramente si la sustancia transferida es un ácido nucleico (ARN) o, más probablemente, un complejo antígeno-ARN.

La célula B proviene de la médula ósea (de ahí su nombre, derivado de *bone marrow*). Fue descubierta primero en los pájaros en un órgano linfóide: la bolsa de Fabricio. En los animales se encuentra este tipo de célula también en el bazo y en los ganglios linfáticos. Su aspecto es el de un linfocito o el de un plasmocito. Esta última célula posee una "maquinaria" de síntesis proteica muy desarrollada: el retículo endoplásmico. Los anticuerpos son sintetizados sobre los ribosomas que tapizan las vesículas de este retículo. El linfocito no tiene un equipo de síntesis tan desarrollado, pero no hay duda de que es también productor y secretor de anticuerpos.

El nombre de célula B caracteriza una categoría celular funcional, y no un tipo morfológico: se trata en suma de una noción teórica que ha sido puesta de manifiesto por Claman¹⁰ y por Miller y Mitchell¹¹ cuando estos autores han demostrado que *dos tipos* de células linfoides (además de los macrófagos) concurrían en la síntesis de anticuerpos: la célula B, que produce y segrega el anticuerpo, y la célula T que interviene en la sensibilización de la célula B.

● La célula T es una célula derivada del timo. Se sabía desde hacía tiempo que el timo, que es un órgano vestigial en el adulto, tenía un cierto papel inmunológico, pero sólo hace muy poco, gracias a los trabajos de Miller, se advirtió su gran importancia en la defensa inmunológica. Los ratoncillos recién nacidos timectomizados (privados de timo por una operación) se defienden muy mal contra todo tipo de infección y pueden aceptar injertos de piel de ratón de otras razas, cuando estos injertos serían indiscutiblemente rechazados por un ratoncillo normal (fig. 8). Existe un ejemplo natural de una deficiencia, el de los ratones "desnudos", que están genéticamente desprovistos de timo. Pero no son estas células T las que fabrican los anticuerpos; su presencia es indispensable porque reaccionan con el antígeno (por un mecanismo actualmente desconocido), después estimulan las células B (estimuladas ellas mismas, por su parte, por el antígeno o uno de los determinantes de éste).

10. J. Claman, *J. Immunol.*, 97, 828, 1966.

11. J.F.A.P. Miller y G.F. Mitchell, *Nature*, 216, 659, 1967.

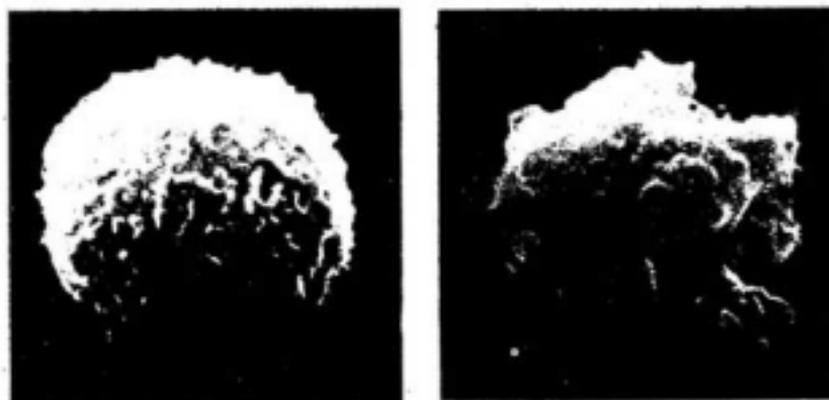


Figura 8. Se pueden observar los linfocitos de la sangre humana, por ejemplo, por un procedimiento de microscopía electrónica llamado de "barrido". Este procedimiento permite dar la impresión de una imagen en tres dimensiones. Sobre este montaje fotográfico se ve, a la izquierda, un linfocito de sangre humana libre con las diferentes vellosidades que caracterizan su superficie cuando esta célula no está ligada; a la derecha, un linfocito de la sangre humana con sus pedículos dirigidos hacia un soporte, que van a permitirle ligarse a él.

La cooperación celular

El descubrimiento de esta cooperación celular ha abierto un nuevo capítulo apasionante de la fisiología inmunitaria. Me parecen esenciales dos aspectos de esta cooperación: el detalle del procedimiento de cooperación y la especificidad de ésta.

En lo que concierne al primer punto, nuestras ideas han evolucionado desde hace diez años. Mientras que después del descubrimiento del fenómeno de cooperación entre células T y B se pensaba que esta cooperación se hacía por *contacto directo*, se sabe ahora que esta colaboración se ejerce por medio de *sustancias* producidas por las células T y que, *difundiéndose*, pueden alcanzar las células B. Esta concepción, más razonable que la del contacto, da una probabilidad de acción mucho mayor a las células T que a las B.

El problema fundamental que queda planteado concierne a la especificidad de la estimulación de la célula T: ¿hay un clon especial de células T preparado a reaccionar para cada antígeno susceptible de penetrar en el organismo? ¿o esta estimulación tiene lugar de manera no

específica, es decir, no importa qué antígeno estimulado, no importa qué célula T? Dicho de otra manera, ¿las células T poseen en su superficie receptores específicos (no solo tipo de receptor por clon) para el antígeno? Es difícil tener actualmente una respuesta a esta pregunta, más aún cuando la *identificación misma de la célula T cada vez es menos segura*.

Ninguna característica segura permite actualmente definir una célula T. Se piensa cada vez más que la célula T es un *estado fisiológico* por el que pasan numerosas células linfoides, más que un tipo celular invariable.

¿Por qué una sustancia es inmunológica?

Esta cuestión está lejos de ser resuelta. Se está actualmente con respecto a ella en un estado empírico y descriptivo. Se sabe, por ejemplo, que una sustancia debe tener un peso molecular mínimo para ser antigénica, que ciertas configuraciones químicas son más antigénicas que otras, etc.

Por otra parte no es posible hablar de inmunogenicidad absoluta, pero hay que considerar la "pareja" antígeno-receptor. En efecto, la condición fisiológica del animal receptor, la administración eventual de sustancias adyuvantes (BCG, aceite mineral, lisolecitina, etc.) y finalmente la constitución genética de este animal juegan un papel determinante, y esto *de manera diferente* para cada uno de los tipos de antígeno examinados.

Entre todas estas preguntas, la que me parece más importante es: ¿qué hace que un organismo no reaccione a sus propios antígenos, mientras que, por otro lado, éstos son perfectamente inmunogénicos en otro organismo genéticamente diferente? Esto es lo que se llama *la tolerancia natural*. Esta cuestión ha progresado desde que se ha descubierto el medio de inducir esta tolerancia por la introducción de estas células en los recién nacidos (Medawar, Brent, Billingham)¹²: es *la tolerancia adquirida*. No obstante, el conocimiento final del mecanismo íntimo que gobierna el autorreconocimiento en todo individuo se nos escapa aún completamente. Todas las teorías sobre la respuesta inmunitaria buscan explicar este fenómeno, pero hay que decir que estas explicaciones conservan un carácter hipotético.

Y, sin embargo, la comprensión de este mecanismo de reconocimiento

12. P.B. Medawar y cols., *Nature*, 172, 603, 1953.

tendría una importancia teórica tanto como un alcance práctico considerable. Cómo se sueña, por ejemplo, en las posibilidades que se abrirían en el dominio de los trasplantes si se pudiera, a voluntad, suprimir el fenómeno del rechazo. Ahora bien, hay que decir que actualmente el problema del rechazo de injerto no está resuelto; se utilizan recursos provisionales para mantener los injertos de riñón. En otros casos (injertos de médula, de corazón, etc.), el rechazo es prácticamente ineludible, y las drogas inmunosupresivas, verdadero veneno, ponen continuamente en peligro la vida del paciente.

Por último, otro campo también se beneficiaría mucho de un mejor conocimiento del mecanismo de la tolerancia: es el del cáncer. En efecto, se admite generalmente que el desarrollo clínico del cáncer está unido no sólo a la aparición de algunas células cancerosas —fenómeno que se produciría corrientemente en todo individuo sano— sino al hecho de que estas células escaparían a la *vigilancia inmunológica* que se ejerce, ordinariamente, sobre todas las células del organismo. Así, la enfermedad cancerosa sería el resultado de un fallo de la defensa inmunitaria, no considerando ya el organismo estas células cancerosas como extrañas (aunque ellas posean, probablemente, antígenos que las distinguen de las células sanas). Es, pues, evidente que el conocimiento del proceso de reconocimiento y de vigilancia debería conducir a mejorar los medios de lucha contra el cáncer e incluso a su curación.

La memoria inmunológica

Cuando un animal ha sido puesto una primera vez en contacto con cierta sustancia extraña inmunogénica (estimulación "primaria"), guarda un "recuerdo" de este contacto y reacciona más violentamente y antes en un encuentro ulterior de la misma sustancia: es el efecto de memoria inmunológica. Esta memoria es ilustrada de manera dramática por el caso de la anafilaxia, descubierta por Portier y Richet en 1907¹³, en donde el segundo contacto de un ser humano con ciertas medusas podía provocar un *shock* fatal.

Esta capacidad de respuesta de manera acelerada e intensiva a un segundo estímulo inmunitario (que se llama "recuerdo") ha sido llamada "reacción secundaria". Esta reacción parece una característica fundamental del mecanismo inmunitario: se la ve manifestarse, en lo que concierne al

13. P. Portier y P. Richet, *Cr. Soc. Biol.*, 54, 170, 1902.

rechazo de los injertos, en los invertebrados; una lombriz, tras haber recibido un injerto de un individuo de otra especie y haberlo rechazado (en siete días, por ejemplo), eliminará un injerto del mismo donante en un tiempo claramente más corto: el animal "recuerda" su primer contacto con el injerto extraño y reaccionará más fuertemente en el segundo contacto. Esta característica es tan fundamental que se puede decir que todo fenómeno de memoria específica en una reacción de rechazo permite asimilar este fenómeno a una respuesta inmunitaria.

Por supuesto, la memoria inmunitaria está muy marcada en lo que concierne a la síntesis de anticuerpos en los vertebrados. La naturaleza, la cantidad y la velocidad de aparición de anticuerpos se modifican en el transcurso de la respuesta secundaria en un ratón, por ejemplo. La afinidad de los anticuerpos para el antígeno generalmente aumenta en el transcurso de esta respuesta; por otra parte, el animal fabrica en esta ocasión aún más anticuerpos IgG (peso molecular 160.000) que anticuerpos IgM (peso molecular 900.000), cuando en el transcurso de la respuesta primaria es a la inversa. Finalmente la velocidad de aparición de las células productoras de anticuerpos, así como su número total —paralelamente a la tasa de anticuerpos en el suero—, se ve muy aumentada. La duración de esta memoria puede ser considerable: de tal manera que los ancianos que fueron afectados por la gran epidemia de gripe de 1918 son todavía, 54 años más tarde, capaces de reconocer la cepa que les infectó y responder mediante una reacción de recuerdo. ¿Por qué procedimiento organiza el individuo esta sorprendente memoria? Sabemos bastante poco en este terreno. Es evidente que hay que postular que el almacenamiento de información se efectúa gracias a *células memoria* o a *sustancias memoria*, o a las dos. La idea de que una célula linfóide podría sobrevivir durante largos años (del orden de la duración de la vida de un hombre), mientras que su tiempo de división es a lo más de 24 horas, parecía fantástico hace algunos años. Hoy, esta posibilidad parece menos improbable. Por otra parte la idea de que una información podría perpetuarse en una estructura estable, por ejemplo, un ácido nucleico (ADN o incluso ARN), y que esta estructura sería transferida de una célula a otra (hospedada momentáneamente en una célula linfóide) tampoco se debe descartar. En todo caso, no se dispone actualmente de ningún trabajo experimental indiscutible que nos permita definirnos de forma inequívoca.

Alcance y validez de las teorías inmunológicas actuales

Está claro que la inmunología debe ocupar un lugar muy importante en la biología moderna, y esto en función de consideraciones teóricas. Ciertamente es un terreno en el que se plantea la pregunta siguiente: ¿cómo sabe el ser vivo reaccionar a una agresión inesperada? ¿Es porque "se adapta" inventando una respuesta original, o es porque "reconoce" en realidad una situación a la que su patrimonio genético ha sido preparado por una selección?

La primera explicación, actualmente abandonada, volvía a tomar la concepción lamarckiana del mundo vivo. La segunda, en la ortodoxia de la teoría darwiniana, de la evolución y de su heredera, la biología molecular, da un carácter estrictamente selectivo a la respuesta inmunitaria. Si parece natural que una teoría selectiva de la síntesis de los anticuerpos se imponga, en gran parte bajo la influencia de los éxitos prodigiosos de la biología molecular, ¿no cabe preguntarse si los hechos particulares a la inmunología encuentran una explicación satisfactoria en el cuadro de una teoría? Ahora bien, todo un conjunto de hechos parecen difíciles de explicar por una teoría selectiva: éstos pueden agruparse en dos secciones, una que concierne a la cinética de la respuesta inmunitaria, otra que se refiere a la diversidad de anticuerpos.

Es difícil comprender, si el desencadenamiento de la respuesta inmunitaria se produce en algunas horas (como se ha constatado), que durante este corto período el antígeno haya tenido tiempo de encontrar las células predestinadas a fijarlo (diez mil sobre cien millones, en un ratón, por ejemplo) y a provocar, tras interacciones diversas entre varias células específicas, la síntesis de anticuerpos por la célula de tipo B.

La segunda dificultad, mucho más considerable aún para la teoría selectiva, es la diversidad prodigiosa de los anticuerpos; esta diversidad no parece estar limitada más que por el ingenio de los químicos que sintetizan nuevos antígenos. Además, se ha descubierto recientemente que, si uno se sirve de los anticuerpos como antígenos para inmunizar un animal, se obtiene la formación de anticuerpos (en suma de anti-anticuerpos), poniendo así en evidencia una especialidad particular de la molécula de anticuerpos: la idiotipia. Se ve que, en teoría al menos, se puede multiplicar casi al infinito el número de las especificidades anticuerpo.

¿Hay en el núcleo de los inmunocitos un almacenamiento suficiente de genes como para codificar todos los anticuerpos que pueden ser fabricados? Hasta hace poco este número era considerado como muy

grande, del orden de diez millones; parece ahora¹⁴ que el número de genes operacionales diferentes sería mucho más pequeño, del orden de 50.000.

Si este último número se revela exacto, aportaría una limitación considerable en la teoría selectiva, pues si se admite incluso que el 20% del genoma está exclusivamente consagrado a la reacción inmunitaria, no podría codificar más que para diez mil anticuerpos diferentes, lo que parece no dar cuenta de la gran diversidad de anticuerpos.

Estas últimas observaciones no implican, para mí, que deba descartarse definitivamente una teoría selectiva de la formación de anticuerpos; por el contrario, es la teoría que actualmente admiten la mayor parte de los inmunólogos. Yo quiero simplemente subrayar que esta teoría tropieza aún con dificultades experimentales muy serias. O bien será preciso resolver éstas en los años por venir, o bien habrá que adoptar nuevas concepciones que, integrando lo adquirido por la biología molecular, sobrepasen a ésta adoptando explicaciones originales especialmente adaptadas a la inmunología.

Para concluir... provisionalmente

El establecimiento de una ciencia exige la puesta al día de hechos, después la interpretación de estos hechos en el cuadro de una hipótesis explicativa que se expresa en forma de una ley.

Estos hechos deben ser indiscutibles, es decir, reproducibles por todos y, si es posible, susceptibles de un análisis cuantitativo. Del mismo modo que se convirtió la física en ciencia exacta, apartándose poco a poco de los hechos vagos o incontrolables para apoyarse en observaciones sólidas, indiscutibles (frecuentemente al principio astronómicas o mecánicas), a partir de las que han podido establecerse explicaciones generales que se conocían.

La biología está, comparada con la física, en una situación muy diferente: los hechos sobre los que se apoya son mucho menos sólidos (menos "duros" ha dicho un autor americano), las relaciones entre estos hechos son mucho más complejas —menos unívocas—; por consiguiente, la "selección" de los hechos fundamentales, previa a la construcción de una hipótesis explicativa (la "teoría"), resulta mucho más difícil.

14. F. Crick, *Nature*, 234, 25, 1971; S. Ohno, *Nature*, 234, 134, 1971.

Todas las ramas de la biología no están en el mismo estadio en lo que se refiere a la solidez de los hechos que constituyen su armadura: la inmunología (ciencia de la inmunidad) es notoriamente una de las disciplinas biológicas en las que lo que se sabe (los hechos "duros") es relativamente muy modesto con respecto a lo que se cree saber. Aún entonces conviene distinguir lo que yo llamaría la inmunología de estructura, o inmunoquímica de anticuerpos, que se apoya ahora sobre pruebas extremadamente sólidas, y la inmunología celular, que se fija como objetivo el estudio de los mecanismos de síntesis de los anticuerpos por el tejido y las células inmunológicamente competentes. En este último campo existe un montón enorme de hechos con frecuencia incontrolables —que emanan de la clínica, de la tradición, de experiencias poco rigurosas—, entre los cuales se debe hacer una selección, no sólo de los hechos duros, sino también de los hechos "significantes", es decir susceptibles de ser incorporados en una hipótesis explicativa estructurada.

Es verdad, por otra parte, que los hechos sólidos sobre los que se apoya la inmunoquímica de estructura de los anticuerpos —la composición química de las moléculas de anticuerpos— no parecen conducir, por sí solos, a la comprensión de la actividad de los anticuerpos, y menos todavía a la de su modo de síntesis. En este terreno, la proposición célebre de Francis Crick: "Si no comprende usted una función, estudie una estructura", parece inoperante.

La inmunología es, por consiguiente, una ciencia no fijada, que verá seguramente numerosas teorías explicativas sucederse antes que podamos escribir con certidumbre cómo un antígeno provoca la síntesis de un anticuerpo en el organismo al que es administrado y, más generalmente, cómo todo organismo sabe distinguir entre las sustancias que le son propias (el "sí mismo") y las que le son extrañas.

La Recherche, febrero 1973

**8. EMBRIOLOGIA MOLECULAR Y
DIFERENCIACION CELULAR**

Jean Brachet

1. Las etapas de la embriología

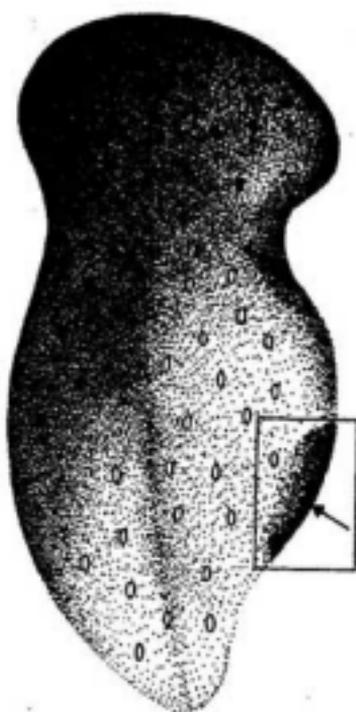
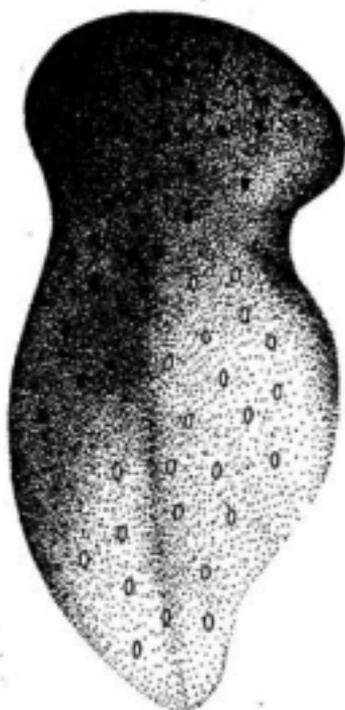
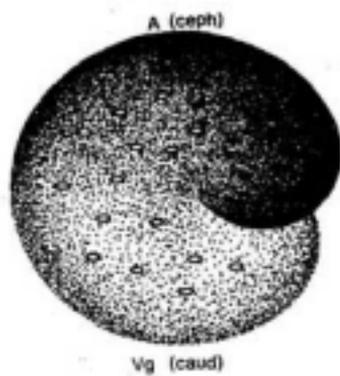
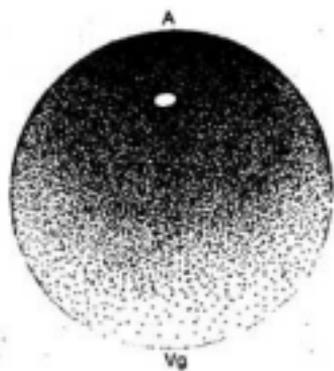
En el transcurso del desarrollo embrionario, hacen su aparición formas y estructuras nuevas: esto es lo que se entiende por *morfogénesis*. Pero sería un error creer que la aparición de nuevos órganos se limita a cambios estrictamente morfológicos, apoyándose únicamente en la forma y la estructura: la morfogénesis está estrechamente ligada también al nacimiento de nuevas funciones fisiológicas y a transformaciones profundas sobre el plano bioquímico. Por ejemplo, es fácil reconocer, al microscopio, las células contráctiles del corazón desde el momento en que este órgano se forma en el joven embrión: presentan una estriación típica, que muestra la figura 2. Pero estas células no serían células cardíacas si no estuvieran dotadas de la capacidad de contraerse de manera autónoma, capacidad de la que están desprovistas las fibras —igualmente estriadas— que forman nuestros músculos voluntarios; las células cardíacas y musculares no serían capaces de contraerse si no contuvieran “proteínas contráctiles”, la actina y la miosina. Son, en el fondo, estas proteínas particulares las que dan su sello específico (contractilidad, estriación) a las células cardíacas. Sucede lo mismo con los glóbulos rojos, que deben su color a la presencia de hemoglobina. Sin esta proteína pigmentada, los glóbulos rojos serían incapaces de cumplir su función, que consiste en transportar el oxígeno del pulmón hacia los otros órganos. Los glóbulos rojos y las células cardíacas tienen un origen embrionario muy próximo; lo que los diferencia fundamentalmente es que estas células tienen sintetizadas proteínas particulares, altamente específicas (hemoglobina o actina y miosina). El problema de la diferenciación celular está, pues, mirándolo



Figura 1. *Acetabularia* es un alga común en el Mediterráneo. Esta célula única es gigante; mide 5 cm de largo y no posee más que un solo núcleo. Este último es sorprendentemente resistente. No contento con sobrevivir varios meses, es capaz de crecer e incluso de formar un "sombrero" nuevo, como testimonian las cuatro sombrillas representadas aquí: nacieron sobre fragmentos anucleados después de que el alga se hubiera cortado en dos. La morfología del sombrero es controlada por los genes del núcleo; sin embargo, un sombrero típico se forma en su ausencia... Esta paradoja y muchas otras son resueltas poco a poco gracias al rápido avance de la embriología molecular.



Figura 2. Las fibras musculares del corazón constituyen un ejemplo típico de la diferenciación celular que se produce en el curso del desarrollo embrionario. Se ve, al microscopio, la estriación característica de las fibras musculares cardíacas. Esta estriación se vuelve a encontrar en los músculos voluntarios: es debida a la acumulación de proteínas específicas (actina y miosina) que son capaces de contraerse. La aparición de estas proteínas contráctiles causa la diferenciación a la vez bioquímica y morfológica del músculo. Cómo puede ser que el huevo fecundado dé lugar a células tan especializadas como las fibras musculares cardíacas es uno de los grandes misterios de la biología actual.



bien, unido al de la síntesis de proteínas específicas en el transcurso del desarrollo embrionario. Comprender cómo y por qué estas proteínas se sintetizan en una región bien determinada del embrión y en un estadio concreto de su desarrollo es una de las tareas principales de la *embriología molecular*: ésta se propone, en resumen, dar cuenta de la diferenciación embrionaria en función de las propiedades químicas y físicas de las macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) constitutivas de cada tipo celular.

El problema fundamental que nos plantea la diferenciación embrionaria (y está lejos de ser resuelto) es el siguiente: ¿cómo puede ser que de un huevo fecundado, que ha recibido sus genes de su padre y de su madre, puedan nacer todos los órganos que están presentes en el adulto? ¿Cómo puede ser que un número restringido de células —que deberían, en principio, poseer los mismos genes que las otras— se ponga, en un momento dado, a sintetizar hemoglobina y a diferenciarse en glóbulos rojos? Si se eliminan estas “células madre” de los glóbulos rojos por vía quirúrgica, el embrión es condenado a morir de anemia más pronto o más tarde, ya que las células vecinas son incapaces de sintetizar hemoglobina y convertirse en glóbulos rojos, aunque en principio dispongan de la misma información genética.

Figura 3. Representación esquemática de los gradientes morfogénéticos y de la teoría de Morgan sobre la diferenciación embrionaria.

A. El huevo virgen o fecundado presenta ya un gradiente de polaridad: arriba, el polo animal (A), rico en ribosomas, es la sede de importantes síntesis proteicas; abajo, el polo vegetativo (Vg) está lleno de materiales de reserva (vitelo). El polo animal formará más tarde la cabeza del embrión y el polo vegetativo, su cola. En el huevo fecundado, se puede distinguir el lado dorsal (D) del lado ventral (V). El núcleo del huevo recientemente fecundado está inactivo.

En la gastrulación, las mitades dorsal (D) y ventral (V) se reconocen con facilidad. Los núcleos, que eran inicialmente idénticos, se modifican: los genes se hacen activos en la mitad dorsal, mientras que quedan inactivos en la mitad ventral. Un gradiente dorso-ventral de actividad genética (síntesis de RNA) se superpone al gradiente inicial de polaridad.

C. Los gradientes están más acusados en el joven renacuajo: la actividad genética y la síntesis de las proteínas disminuyen de la cabeza (ceph.) hacia la cola (caud.), y de la espalda (D) al vientre.

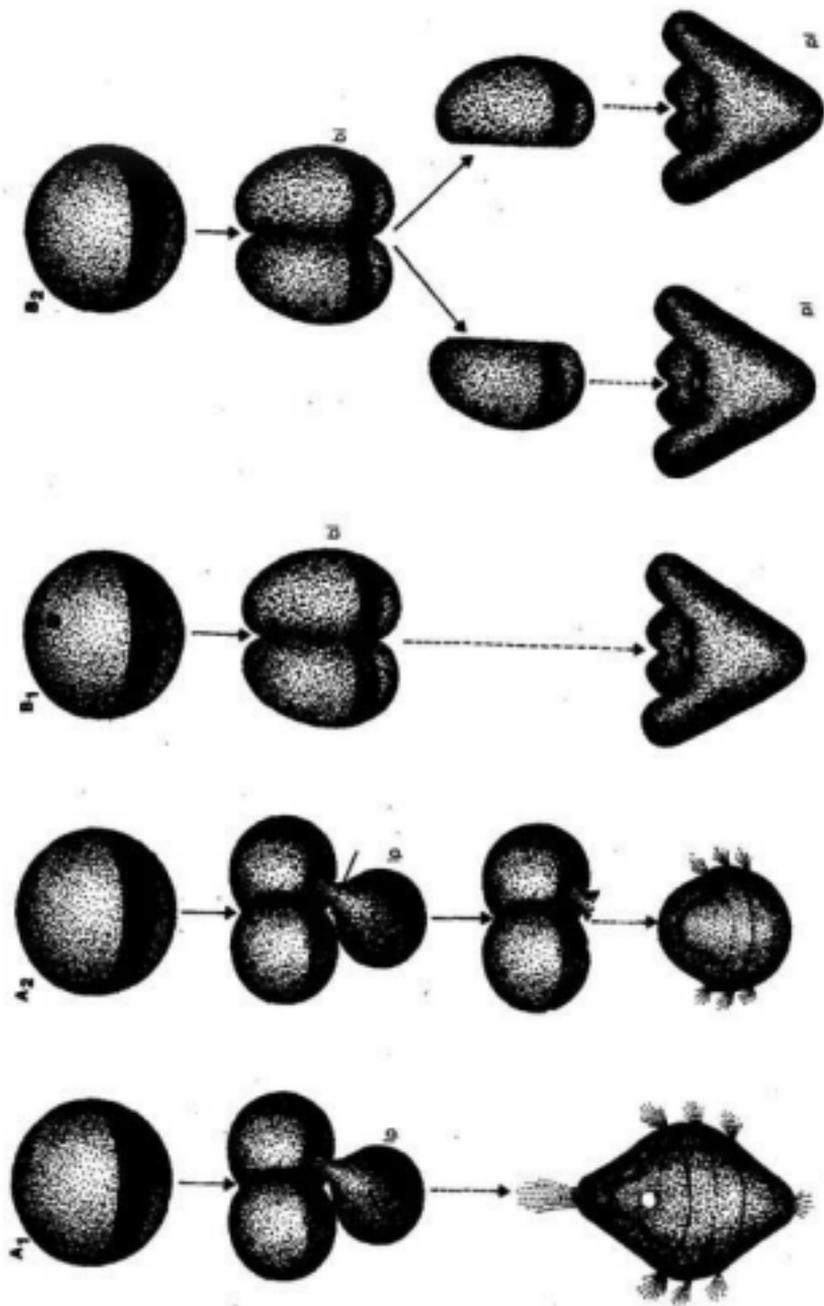
D. La flecha indica la localización del islote sanguíneo: este territorio es el único que puede dar nacimiento a glóbulos rojos y sintetizar hemoglobina. Si se extrae quirúrgicamente, el embrión está condenado a morir de anemia.

Aristóteles había descubierto los gradientes morfogénéticos

Antes de examinar las diversas teorías que han sido propuestas para intentar explicar este enigma, conviene situarse durante unos instantes en una perspectiva histórica, y decir después algunas palabras respecto al tema de la evolución de la embriología. En efecto, el material ideal para el estudio de la diferenciación celular será siempre el embrión en vía de desarrollo.

Es probable que, desde el momento lejano en que el hombre puso huevos de gallina en incubadoras artificiales (y esto nos remonta a varios millares de años), se le ocurriese romper, de vez en cuando, la cáscara de un huevo y observar el espectáculo sorprendente de la transformación del huevo en pollito. Parece ser que Aristóteles nos dejó la primera descripción escrita del desarrollo de un huevo de gallina y observó un hecho importante: la cabeza del embrión se desarrolla más deprisa que su cola. Aristóteles había descubierto los *gradientes morfogénéticos*, es decir, el hecho de que la capacidad ("potencialidad") de desarrollo decrece yendo de la cabeza hacia la cola (fig. 3). Sabemos ahora que las potencialidades morfogénéticas disminuyen también yendo del dorso hacia el vientre. La figura 3D representa, de manera esquemática, el doble gradiente (cefalo-caudal y dorsoventral) que cabe apreciar en un joven renacuajo; se ha representado, sobre la misma figura, la región localizada, llamada *isloté sanguíneo*, que da nacimiento a los glóbulos rojos y en donde tiene lugar la síntesis de la hemoglobina.

Aristóteles trabajó, sin saberlo, en *embriología descriptiva*, cuando observaba el desarrollo del huevo de gallina. Esta ciencia continúa progresando, gracias al empleo de medios ópticos (el microscopio electrónico, en particular) cada vez más perfeccionados. Pero la simple descripción de los hechos no puede bastar para satisfacer la curiosidad humana: a principios de nuestro siglo se desarrolló la *embriología experimental* (que a mi padre, Albert Brachet, le gustaba llamar embriología "causal"): delicadas intervenciones quirúrgicas han permitido establecer con precisión el *mapa de los esbozos* (fig. 4), es decir, la topografía de los territorios que dan ulteriormente origen a los diversos órganos de la larva y del adulto; estos mapas pueden ser trazados en una fase muy poco avanzada del desarrollo, mientras que el embrión está aún completamente indiferenciado. Otras experiencias han demostrado que algunos huevos están formados por un *mosaico* de territorios, llamados *localizaciones germinales*: su destrucción no puede ser totalmente reparada y el embrión



operado queda fatalmente imperfecto y anormal (fig. 5A). En otras especies, por el contrario, las lesiones sufridas por el huevo en una fase temprana son perfectamente reparadas y se obtiene, gracias a un fenómeno de *regulación*, un embrión normal. La figura 5B demuestra un caso extremo de regulación, descubierto desde 1900 por H. Driesch: en el transcurso de su desarrollo normal, el huevo de erizo de mar fecundado se divide en dos células llamadas *blastómeros*; cada blastómero da origen a medio erizo de mar. Pero si se separan los dos primeros blastómeros uno de otro, se constata que cada uno de ellos da origen a un erizo de mar completo.

Más allá del neo-vitalismo de Driesch nace la embriología molecular

Driesch no propuso más que una explicación filosófica de su experiencia: si "la parte da el todo" (es decir, si un solo blastómero da origen a un embrión completo), es porque el huevo contendría una "entelequia"; esta fuerza vital, cuyo nombre se tomó de la filosofía aristotélica, jugará, según las circunstancias, el papel de un freno o de un acelerador. Por definición, la entelequia no tendría localización espacial ni sería accesible a la experimentación.

La embriología *química* o *molecular* no puede satisfacerse con el neo-vitalismo de Driesch, ya que intenta precisar la naturaleza física y química de las localizaciones germinales y de los gradientes morfogénicos. Se esfuerza por establecer las bases moleculares de la regulación y de la diferenciación embrionarias. Yo no creo que haya lugar para establecer una distinción estricta entre embriología química y embriología

Figura 5A. Desarrollo en mosaico:

1. Cuando el huevo de un gusano o de un molusco va a dividirse en dos, toma momentáneamente la forma de un trébol, a causa de la presencia de un lóbulo polar (*lp*).

2. Si se elimina el lóbulo polar, que no contiene núcleo, se obtiene la formación de una nueva larva anormal. El citoplasma del lóbulo polar constituye una localización germinal, indispensable para la producción de un embrión normal. Su ablación no puede ser corregida por el resto del embrión.

Figura 5B. Por el contrario, la regulación embrionaria permite a medio huevo de erizo de mar dar origen a una larva normal.

1. En el transcurso del desarrollo normal, el huevo se divide en dos blastómeros (*bl*) y forma enseguida una larva característica, la pluteus (*pl*).

2. Si se separan los dos primeros blastómeros, cada uno de ellos da origen a una pluteus completa (experiencias de H. Driesch).

molecular: empecé mi carrera científica hace cuarenta y cinco años, en la vía de la embriología química, es decir, del análisis bioquímico del desarrollo embrionario. El azar ha hecho que me haya interesado, desde este momento, en los ácidos nucleicos: como la embriología molecular se ocupa, ante todo, del papel de los ácidos nucleicos y de las proteínas en el desarrollo, yo he trabajado en embriología molecular sin saberlo durante casi toda mi vida (como el señor Jordán hacía prosa ignorándolo totalmente). La embriología molecular de hoy se distingue, sin embargo, de la embriología química de mi juventud por una diferencia importante: ha heredado el modo de pensar y las técnicas de la biología molecular. Se preocupa, ante todo, de las interacciones que se producen a cada instante entre los genes nucleares y el citoplasma: son en efecto estas interacciones nucleocitoplásmicas las que dirigen la diferenciación embrionaria.

Después de estas observaciones de orden general, es importante examinar rápidamente las principales teorías que han sido propuestas para intentar explicar la diferenciación celular.

2. Las teorías de diferenciación embrionaria

Hemos visto que la embriología experimental ha demostrado claramente la importancia del papel que juega el *citoplasma* en el transcurso de las primeras etapas del desarrollo embrionario. Pero otras experiencias demuestran, de manera no menos perentoria, la necesidad de una intervención del núcleo para que el desarrollo se continúe más allá del período inicial de segmentación del huevo: en ausencia completa del núcleo, el huevo puede, en el mejor de los casos, segmentarse varias veces anárquicamente. Si se irradia el huevo y el espermatozoide con rayos X, diversos blastómeros procedentes del huevo fecundado poseerán un número variable de cromosomas: esta condición *aneuploide* es muy *letal*; el huevo muere, en general, en el momento en que alcanza el estado blástula, que marca el final del período de segmentación del huevo fecundado. En esta fase, las células no presentan aún ninguna diferenciación visible al microscopio. Es evidente que ninguna teoría puede dar cuenta de los hechos si no tiene en consideración las interacciones que se producen entre el núcleo y el citoplasma, sobre todo en el transcurso de las primeras etapas del desarrollo embrionario.

La teoría cromosómica de Roux y Weismann...

Desde una perspectiva histórica se puede decir que la primera teoría que haya intentado explicar la diferenciación embrionaria es la que propusieron Weismann y Roux. Wilhelm Roux y Albert Brachet demostraron la importancia para la morfogénesis de los huevos de rana, de un territorio (*el creciente o semiluna gris*) que se sitúa entre los dos polos del huevo (el polo animal pigmentado y el polo vegetativo blanco). Esta zona de transición, marcada *c* en la figura 4, corresponde al futuro lado dorsal del embrión; si se destruye por punción el creciente gris de un huevo recién fecundado y aún sin dividir, el desarrollo de los órganos axiales del embrión (sistema nervioso, *chorda* dorsal) es fortísimamente inhibido. Las punciones efectuadas en otras regiones del huevo producen efectos mucho menores. Experiencias más recientes de Curtis han demostrado que la región del huevo fecundado que es realmente importante es el *córtex* del creciente gris, es decir, la delgada capa de citoplasma pigmentado, de 1 a 2 micras de espesor, que se encuentra inmediatamente por debajo de la membrana celular: la eliminación del *córtex* dorsal del huevo fecundado impide todo desarrollo ulterior.

Estas experiencias parecen demostrar, una vez más, la importancia del papel que juega el citoplasma en el desarrollo ulterior del huevo. No obstante, la teoría propuesta por Roux y Weismann, en 1885, para explicar la diferenciación embrionaria es una teoría *cromosómica*: los cromosomas serían portadores de determinantes hereditarios (diríamos ahora genes) distintos para la diferenciación del embrión en una mitad dorsal (sistema nervioso, *chorda*, músculos) y una mitad ventral (intestino, glóbulos rojos). Las primeras mitosis de segmentación que dividen el huevo fecundado en blastómeros dorsales y ventrales serían desiguales desde el punto de vista genético: los núcleos dorsales y ventrales, desde el principio de la segmentación del huevo, serían, pues, genéticamente diferentes.

La experiencia ha permitido eliminar la teoría de Weismann-Roux. En efecto, ha sido posible destruir electivamente uno de los dos primeros núcleos del huevo en segmentación: no obstante, el desarrollo, tanto en los insectos (Seidel) como en los anfibios (Spemann), ha sido normal. Los descendientes del núcleo "ventral" que han colonizado el citoplasma dorsal se han comportado exactamente como lo habría hecho un núcleo "dorsal". Estas experiencias, que son de una importancia fundamental, demuestran la *equipotencialidad* de los núcleos en el transcurso de la segmentación del huevo: en esta fase precoz del desarrollo, todos los núcleos son idénticos y, por consiguiente, intercambiables.

...no tenía en cuenta las interacciones del núcleo y del citoplasma

Es a un célebre genetista americano, T.H. Morgan que fue también un notable embriólogo) al que se debe el haber propuesto, en 1934, una teoría de la diferenciación que es valedera aún hoy a grandes rasgos y que tiene en cuenta las interacciones nucleocitoplásmicas que se producen en el transcurso del desarrollo. Morgan, partiendo de dos hechos que nos son ya conocidos (la heterogeneidad del citoplasma del huevo y la equipotencialidad de los núcleos durante la segmentación del huevo), ha propuesto que la actividad de los genes sería modificada por el citoplasma circundante. Como muestra la figura 3A, núcleos idénticos serían distribuidos en un citoplasma heterogéneo; bajo la influencia de este citoplasma, ciertos núcleos se modificarían, de tal manera que algunos de sus genes se harían activos; su activación provocaría modificaciones del citoplasma circundante que se haría entonces más heterogéneo aún. Este juego de interacciones mutuas entre los genes y el citoplasma conduciría finalmente a la diferenciación celular.

Basta con poco para modernizar esta teoría y situarla en el cuadro de la biología molecular: diríamos hoy que los núcleos, durante el período inicial de segmentación, están "reprimidos" y, por consiguiente, incapaces de sintetizar las moléculas de ARN mensajero (mARN) necesarias para que el citoplasma sintetice nuevas especies de proteínas. Después de la segmentación (es decir en la gastrulación), los núcleos de las regiones más activas del embrión serían "desreprimidos": sus genes dirigirían la síntesis de nuevos m-ARN y, por consiguiente, nuevas proteínas.

Para comprender la diferenciación, el trasplante de núcleos...

Veremos más adelante que la embriología molecular ha demostrado que va bien así. Pero debemos, antes, plantearnos una pregunta cuya importancia fundamental no había pasado inadvertida a la sagacidad de Morgan: ¿en qué momento los núcleos dejan de ser equipotenciales? En otros términos, ¿en qué fase del desarrollo se diferencian los núcleos?

La pregunta ha sido atacada de manera directa por Briggs y King, que tuvieron éxito por primera vez, en 1952, en los *trasplantes nucleares*: la experiencia consiste en inyectar el núcleo de una célula elegida por el experimentador en el citoplasma de un huevo virgen del que se ha quitado el núcleo: si el núcleo trasplantado ha conservado las mismas potencialidades que el del huevo fecundado, debería obtenerse un desarrollo

completo, llegando hasta el adulto. Esto es lo que sucede cuando se implanta el núcleo del huevo en vía de segmentación (blástula) en un huevo virgen anucleado. Pero la interpretación de los resultados se hace más delicada a continuación, porque numerosos núcleos trasplantados presentan anomalías cromosómicas cuando se multiplican en el citoplasma de la célula virgen anucleada; estas anomalías son más frecuentes —provocando la detención del desarrollo debido a la letalidad— cuanto más edad tienen los embriones cuyos núcleos son trasplantados. En resumen, el envejecimiento de los núcleos, que se manifiesta por la incapacidad de multiplicarse normalmente en el jovencísimo citoplasma de un huevo virgen, se manifiesta ya en la fase blástula, es decir, menos de un día después de la fecundación del huevo. Este hecho complica mucho, evidentemente, la interpretación de las experiencias de trasplante nuclear. Felizmente, Gurdon, refiriéndose a un material biológico particularmente favorable (el *Xenopus*, sapo de origen sudafricano) y utilizando algunos artificios técnicos, que no podemos describir aquí, ha llegado a aportar recientemente una respuesta clara a las preguntas que se planteaba ya Morgan: ha trasplantado en huevos vírgenes anucleados núcleos procedentes de células adultas perfectamente diferenciadas (células de hígado, riñón, pulmón, etc.) y ha obtenido en un débil porcentaje de casos la formación de renacuajos prácticamente normales. Estos renacuajos eran, naturalmente, el asiento de una diferenciación celular muy prolongada y poseían, pues, un sistema nervioso, músculos y un corazón capaces de contraerse, riñones, un tubo digestivo, etc. Esta experiencia tan importante demuestra que los núcleos del adulto pueden sustituirse completamente en el núcleo del huevo recién fecundado; han conservado intacta toda la información genética contenida en el núcleo del huevo y en el del espermatozoide. Los genes presentes en el núcleo de la célula adulta diferenciada son, pues, idénticos a los del huevo fecundado y pueden expresarse normalmente cuando se les coloca en un medio favorable (el citoplasma de un huevo virgen anucleado). En otros términos, *los núcleos no se diferencian de manera irreversible en el transcurso de la vida del individuo.*

... y el estudio del funcionamiento genético de las bacterias se completa

Si volvemos a la teoría de Morgan, vemos que las experiencias de Gurdon demuestran que la heterogeneidad del citoplasma no puede afectar a la naturaleza misma de los genes; puede, por el contrario, afectar a su

expresión, es decir, a su *funcionamiento*. La naturaleza de los factores que regulan la actividad de los genes, poniendo en marcha o deteniendo su funcionamiento, es la llave del problema de la diferenciación celular.

Gracias sobre todo a Jacob y Monod, sabemos muchas cosas sobre el control de la actividad genética en las bacterias. No se puede dejar de admirar la manera exacta y compleja con la que se efectúa este control en un organismo tan "simple" como el bacteriófago λ . Al reflexionar sobre la existencia de delicados mecanismos de regulación tanto negativos (bloqueo de la actividad genética por un represor específico) como positivos en el caso de un bacteriófago, uno no puede impedir el preguntarse, con inquietud, hasta dónde puede llegar la complejidad de estos mecanismos en el caso de un huevo en vía de desarrollo. Si la teoría de Morgan modernizada (activación selectiva de ciertos genes —por ejemplo, los de la hemoglobina en el momento en que los glóbulos rojos van a diferenciarse— en unas regiones bien definidas del embrión y en fases concretas) queda como guía indispensable para el embriólogo, está claro que no podrá satisfacernos en tanto no conozcamos mecanismos moleculares que permitan la activación de un gen y la inactivación de otros.

Se han hecho esfuerzos en el campo teórico para explicar la diferenciación celular partiendo del modelo establecido por Jacob y Monod respecto a la regulación de la actividad genética en las bacterias. Jacob ha demostrado, por otra parte, que este modelo, mediante algunos arreglos, puede servir de base a una teoría genética de la diferenciación celular. Un modelo mucho más complejo, que no nos es posible presentar aquí, ha sido propuesto después por Britten y Davidson. No deja de tener interés el subrayar que estos autores han modificado recientemente su modelo con el fin de tener en cuenta la heterogeneidad del citoplasma, factor que los genetistas tienden generalmente a descuidar. Desgraciadamente, teorías tan complejas como la de Britten y Davidson no se harán accesibles a una verificación experimental más que cuando la genética de los eucariontes pueda rivalizar con la bacteria, de lo que aún estamos muy lejos.

Algunas teorías mal encaminadas

Algunos investigadores, principalmente Scarano, han intentado explicar la diferenciación celular suponiendo que las moléculas de ADN soportarían modificaciones químicas (metilaciones, por ejemplo) en el transcurso del desarrollo embrionario. Tal hipótesis es difícilmente compa-

tible con los resultados experimentales de trasplantes nucleares de Gurdon que acaban de ser discutidas. Encuadra mal también con numerosos casos conocidos de "diferenciación", en donde se ve a las células, en ciertas condiciones de cultivo, volver a un estado menos diferenciado (por ejemplo, pérdida del pigmento por parte de células pigmentadas).

Otra teoría original, que tendremos ocasión de discutir más adelante, es la de una *amplificación selectiva de un gen*: ciertos genes, por ejemplo, los que dirigen la síntesis de la hemoglobina, se replicarían independientemente del resto del genoma en las células madres de los glóbulos rojos. Los genes de la hemoglobina, al no existir en número suficiente más que en estas células, harían de ellas las únicas capaces de sintetizar hemoglobina.

Por último, algunas teorías —a decir verdad poco extendidas en este momento— ponen el acento sobre el *citoplasma* más bien que sobre el núcleo para dar cuenta de la diferenciación celular. Imaginan la existencia en el citoplasma de partículas nucleoproteicas capaces, como los virus, de reproducirse de manera autónoma: son los hipotéticos "*plasmagenes*". Existe, efectivamente, cierto número de partículas citoplásmicas capaces de replicarse de manera autónoma: son los centriolos de las células en vía de división, los cinetosomas de los cilios y de los flagelos, las mitocondrias y los cloroplastos de las plantas verdes. Como las mitocondrias y los cloroplastos contienen ADN y pueden ser el emplazamiento de mutaciones, podrían, en teoría, jugar un papel en la diferenciación celular. De hecho, se ha demostrado que las mitocondrias son necesarias en la diferenciación muscular en larvas jóvenes de tunicados. Pero la información genética presente en el ADN de las mitocondrias, principalmente en el caso de los huevos, es demasiado débil para poder atribuirles una larga autonomía frente a los genes nucleares. Es probable que la intervención de las mitocondrias en la diferenciación embrionaria de los tunicados se limite a la producción de la energía requerida para la síntesis de macromoléculas específicas.

Recientemente, Bell ha afirmado la presencia de partículas que contenían ADN susceptibles de replicarse de manera autónoma en el citoplasma; para este investigador, estos *I-somas* (I=información) serían responsables de la diferenciación celular. Pero hay que admitir que las pruebas experimentales de su existencia no son aún convincentes.

Conviene, por último, decir algunas palabras sobre las ideas desarrolladas por Curtis: como ya se ha visto, este investigador ha demostrado que el córtex del creciente gris es responsable de las propiedades morfo-

genéticas de este territorio. En una segunda serie de experiencias, Curtis produjo ligeras heridas en el córtex dorsal: algunos huevos así lesionados se desarrollaron normalmente y de ellos nacieron adultos. Curtis tuvo la curiosidad de cruzar estos adultos con individuos normales, comprobando que los embriones procedentes del cruce entre un macho normal y una hembra nacida de un huevo cuyo creciente gris había sido lesionado son letales: la mayor parte de ellos mueren en una fase precoz del desarrollo y muy pocos consiguen el estado adulto. El cruce recíproco (macho nacido de un huevo cuyo creciente gris había sido herido + hembra normal) da, por el contrario, una descendencia normal. Curtis concluyó de esto que el córtex dorsal poseería su propia herencia, debido a la presencia de partículas capaces de una réplica autónoma. Pero las experiencias de control que hemos efectuado recientemente muestran que esta conclusión sólo puede ser aceptada con la mayor prudencia: hemos constatado en efecto que, contrariamente a lo que se pensaba, una lesión discreta del córtex del huevo no afecta únicamente al citoplasma. Tales lesiones alteran también las divisiones celulares (mitosis) que caracterizan la segmentación del huevo; de esto resulta la aneuploidia, que es mucho más frecuente después de las lesiones del córtex dorsal que tras las punciones del córtex ventral. Si las lesiones superficiales del huevo recién fecundado repercuten en los cromosomas, no es sorprendente que el individuo nacido de los huevos cuyo córtex había sido ligeramente lesionado presente anomalías del desarrollo.

Después de este examen rápido de las principales teorías de la diferenciación celular, es importante conocer los experimentos básicos de la embriología molecular. En este sentido, seguiremos el único camino que parece lógico a un embriólogo: partir del oocito ovárico y llegar a las células diferenciadas del embrión avanzado o del adulto.

3. La creación de un nuevo ser

La formación de las células sexuales, los gametos, constituye la fase preparatoria para la morfogénesis de un embrión. No es necesario detenerse mucho en el espermatozoide (fig. 6), pues su papel en el desarrollo embrionario es totalmente secundario con relación al del huevo; se sabe, después de los experimentos de Bataillon y de Loeb, que puede obtenerse un desarrollo normal y completo por partenogénesis.

Al principio de la formación del huevo...

La formación de los huevos, u oogénesis, se caracteriza sobre todo por el crecimiento de las células reproductoras (oocitos) en el ovario de la hembra. Este crecimiento, que puede tomar proporciones gigantescas (un huevo de avestruz es una célula gigante), es debido a la acumulación de un material de reserva, el vitelo. Este último está formado por proteínas, concentradas en gránulos microscópicamente visibles, las plaquetas vitelinas. La proteína principal del vitelo, la *fosvitina*, contiene fósforo y se parece a la caseína de la leche; en efecto, el vitelo y la leche de los mamíferos realizan la misma función: los dos sirven para cubrir las necesidades nutritivas del joven organismo en vía de crecimiento. Las plaquetas vitelinas de los oocitos de los batracios contienen, además de un grueso cristal central de fosfoproteína, pequeñas cantidades de ácidos nucleicos ADN y ARN y enzimas hidrolíticas, capaces de degradar la fosfoproteína, haciéndola utilizable en el transcurso del desarrollo del embrión. Las fosfoproteínas del vitelo no son sintetizadas por el oocito mismo: son producidas en el hígado, tras una estimulación por las hormonas femeninas, después vertidas en la sangre circulante. Son enseguida recuperadas por el oocito, cuya membrana, que está muy

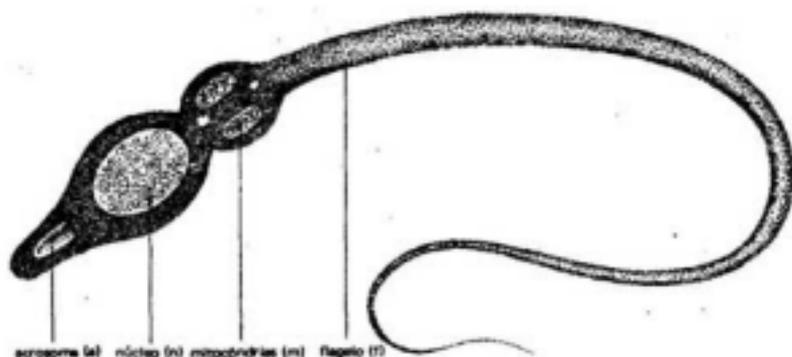


Figura 6. Representación esquemática de un espermatozoide: el acrosoma *a* contiene las enzimas necesarias para disolver las membranas que protegen el huevo virgen. El núcleo *n* contiene ADN bajo una forma compacta que le protege contra los azares de la vida; el DNA encierra en sí todos los caracteres hereditarios paternos. El espermatozoide es móvil gracias a los movimientos de su flagelo *f*. La energía necesaria para que el flagelo pueda moverse proviene de las mitocondrias *m*. En resumidas cuentas, el espermatozoide es una máquina altamente especializada que sirve para inyectar el ADN (los genes) paterno en el huevo.

especializada, deja penetrar en el oocito las moléculas proteicas intactas. Es probable que el ADN vítelino, que sirve sin duda de reserva para la síntesis de los ADN nucleares en el transcurso del desarrollo, sea también el de origen hepático.

Pero el oocito no se limita a acumular productos de reserva recibidos del exterior: él sintetiza también, con gran actividad, sus propios ácidos nucleicos y proteínas (principalmente un gran número de enzimas). La precisión del oocito va hasta sintetizar enzimas que le son probablemente inútiles, pero que le servirán cuando, algunos días después de la fecundación, su sustrato haya hecho aparición. El oocito sintetiza toda la maquinaria que permitirá más tarde al embrión sintetizar sus propias proteínas: en particular el oocito fabrica un número prodigioso de *ribosomas* y un amplio abanico de *ARN mensajeros*.

El estudio de la síntesis de los *ácidos ribonucleicos ribosómicos* (r-ARN) en el transcurso de la oogénesis del *Xenopus* constituye uno de



Figura 7. Los núcleos de los oocitos muy jóvenes de *Xenopus* contienen dos cromatinas distintas: una "cofia" condensada (indicada por flechas) y los cromosomas. La cofia contiene el ADN ribosómico (r-ADN), que dirigirá la síntesis de los ARN ribosómicos (r-ARN). En la fase representada por la figura 7 se produce una síntesis intensa del r-ADN en la cofia: resulta de ello una amplificación gigantesca de genes ribosómicos, que serán cerca de un millón de ejemplares en el oocito de más edad. Esta amplificación permitirá al oocito sintetizar los innumerables ribosomas que son indispensables para la síntesis de sus proteínas en el transcurso del desarrollo.

los capítulos más apasionantes de la *embriología molecular*. En las primerísimas etapas del oocito, bastante antes del principio de la vitelogenésis, son sintetizados en el núcleo dos tipos diferentes de ADN: el ADN *cromosómico* y el ADN *ribosómico* (r-ADN). Este último (que es químicamente diferente del ADN de los cromosomas y que puede ser considerado como un ADN extra-cromosómico) dirige la formación de los nucléolos en el núcleo del oocito y la producción de los innumerables ribosomas que llenan su citoplasma. El r-ADN corresponde, en resumen, a los *genes ribosómicos*; éstos existen en un número enorme de copias en el oocito, gracias a un proceso de *amplificación genética* que se produce al principio mismo de la oogénesis. La figura 7 muestra que, en estos jovencísimos oocitos de *Xenopus*, una parte del ADN forma una "cofia" que sobrepasa los cromosomas. Esta cofia corresponde a los genes ribosómicos (al r-ADN) en vía de replicación: esta replicación es extremadamente intensa, de tal manera que en el oocito existen cerca de un millón de copias de genes ribosómicos (por lo menos los que codifican para los r-ARN macromoleculares 28S y 18S). Estos genes ribosómicos, después que la cofia se dispersa, se vuelven a encontrar en los 1.500

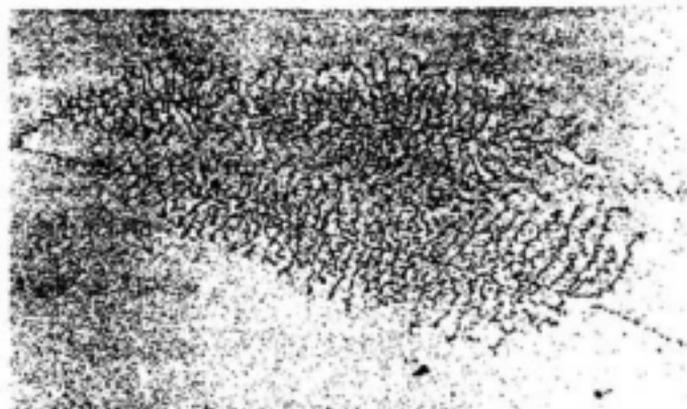


Figura 8. El r-ADN, cuya síntesis se ha visto en la figura 7, se reparte entre 1.000 ó 1.500 nucléolos en el transcurso de la oogénesis; forma ahí los organizadores nucleolares. La figura 8 muestra el extraordinario aspecto de estos organizadores nucleolares, tal como Miller ha llegado a observarlo al microscopio electrónico. Las cadenas de ARN ribosómico han sido sorprendidas en vía de síntesis: se presentan como las barbas de una pluma de pájaro, agarradas a un eje formado por ADN. Algunas regiones del ADN ("espaciadores") son inactivas y no sintetizan ARN. Las regiones activas e inactivas se siguen de una manera sorprendentemente regular.

nucleólos del oocito, donde forman los *organizadores nucleolares*. La figura 8 muestra el aspecto de un organizador nucleolar tal como se puede ver al microscopio electrónico: las regiones que sintetizan los r-ARN se presentan bajo una forma que recuerda a las barbas de una pluma de pájaro; están separadas por regiones mudas, llamadas "espaciadores".

... la maquinaria que permitirá al embrión sintetizar sus propias proteínas se pone en su sitio...

Uno esperaría ver, tras esta prodigiosa amplificación de genes ribosómicos, al oocito puesto inmediatamente a fabricar ribosomas. Sin embargo, no hace nada de eso: el joven oocito de *Xenopus* (de 400 a 200 μm de diámetro) no sintetiza más que los ARN de ligero peso molecular. Los innumerables genes ribosómicos están, pues, completamente *reprimidos*, no funcionales, en esta fase. Esta represión llega a su fin en el momento en que las primeras plaquetas vitelinas hacen su aparición en el citoplasma. En tal punto la producción de ribosomas se hace en extremo intensa hasta el momento en el que (habiendo alcanzado el oocito su talla máxima) la actividad de los genes ribosómicos sufrirá una nueva represión.

La producción de ribosomas no se hace de manera homogénea en el huevo: son mucho más abundantes en uno de los polos (el polo animal) del oocito que en el polo opuesto (llamado vegetativo), donde las plaquetas vitelinas son más numerosas y más voluminosas (fig. 3A). Este *gradiente de polaridad* es muy importante: el polo animal se convertirá en la cabeza del embrión y el polo vegetativo en su cola. Sin esta polaridad, el embrión no tendría "ni cola, ni cabeza". Desgraciadamente, ignoramos todos los factores que controlan el establecimiento del gradiente animal-vegetativo de polaridad.

Durante el gran crecimiento del oocito, los cromosomas toman un aspecto muy particular (fig. 9): las larguísimas fibras de ADN que los constituyen se apelotonan para formar millares de anillos, de tal forma que el cromosoma parece una pluma o un escobillón. Los cromosomas "plumosos" son la base de una síntesis importante de ARN mensajeros (m-ARN) de naturaleza muy variada. No obstante, esta síntesis es insuficiente para que todos los ribosomas puedan enlazarse con las moléculas de m-ARN con el fin de formar polisomas activos en la síntesis de las proteínas: de hecho, el 90% de los ribosomas del oocito son libres y disponibles para la formación de ribosomas. Este punto ha sido demos-

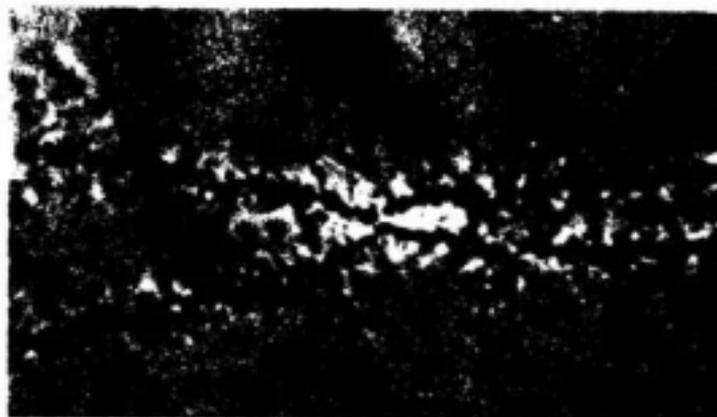


Figura 9. Cromosomas "plumosos" de un oocito de tritón, fotografiados por H.G. Callan. Los cromosomas homólogos están apartados y unidos por un "quiasma". Numerosos anillos se desprenden del eje de los cromosomas: al nivel de estos anillos se sintetizan los ARN mensajeros. Cada anillo es una manifestación microscópicamente visible de la actividad de un gen.

trado recientemente, de manera muy elegante, por Gurdon, quien inyectó en los oocitos de *Xenopus* un m-ARN específico bajo forma purificada (m-ARN de la hemoglobina de conejo); tras la inyección de dicho mensajero, los oocitos sintetizaron durante varios días cantidades crecientes de una proteína que les es totalmente extraña: hemoglobina de conejo.

Esta síntesis masiva de ribosomas en el transcurso de la ovogénesis permite al oocito acumular una reserva de ribosomas suficiente para permitirle alcanzar la fase en la que el renacuajo comienza a alimentarse; lo sabemos porque existe un mutante de *Xenopus* (llamado nu-o) que ha perdido sus organizadores nucleolares después de una delección, y, al no poseer r-ADN, no forma nucléolos y es incapaz de sintetizar ribosomas; sobrevive, no obstante, hasta una fase larvaria bastante avanzada.

... después que el oocito experimente su maduración hará lo que un huevo virgen inerte

Cuando el oocito ha alcanzado su talla final, permanece metabólicamente inerte hasta el momento en el que, bajo la influencia de una estimulación hormonal, experimenta su *maduración* (fig. 10): la membrana nuclear se rompe, los nucléolos desaparecen, sus organizadores nucleolares



Figura 10. Bajo la influencia de una estimulación hormonal, el oocito consigue su maduración.

1. Aspecto de un oocito de rana que no ha sido tratado por la hormona: se ven unos 1.000 nucleólos que contienen el voluminoso núcleo (vesícula germinativa).

2. Oocito tratado durante algunas horas con progesterona: los nucleólos son menos numerosos y más voluminosos; los ribosomas se han acumulado por debajo de la membrana nuclear. Más tarde, la vesícula germinativa desaparecerá completamente. Los cromosomas se condensarán y se reagruparán en el polo animal, agarrados a un huso de maduración. La mezcla del jugo nuclear y del citoplasma, que caracteriza la maduración, es indispensable para que el huevo fecundado pueda dividirse.

son eliminados en el citoplasma; los cromosomas se condensan, emigran hacia el polo animal y el huevo elimina, en más o menos breve plazo, sus dos glóbulos polares: el huevo virgen es una célula haploide y llega a ser, como el oocito maduro, una célula metabólicamente inerte.

Pero el período de maduración en sí mismo se caracteriza por una gran síntesis proteica, inducida por la hormona femenina (progesterona). Cosa curiosa, esta síntesis de proteínas se produce perfectamente en ausencia de toda síntesis de ARN. Si se quita el núcleo del oocito y se trata éste enseguida con progesterona, la síntesis de proteínas inducida por la hormona es perfectamente normal; esta síntesis es, pues, dirigida por los m-ARN preexistentes, sintetizados por los cromosomas plumosos. El papel de las proteínas sintetizadas durante la maduración aún no está bien establecido: sabemos sólo que estas proteínas migran en los núcleos en el transcurso de la segmentación del huevo, y se puede suponer que intervienen en la regulación de la actividad genética. Este período del desarrollo, como lo veremos, se caracteriza sobre todo por la multiplicación de los núcleos, lo que implica una importante síntesis de ADN. Es muy probable que las enzimas requeridas para esta síntesis formen parte de las proteínas sintetizadas durante la maduración: en efecto, se ha demostrado que, si se inyecta un ADN de cualquier origen en un oocito antes de la maduración, no se replica; pero si se inyectan estos mismos ADN en el transcurso de la maduración (o después de ésta), sus moléculas son replicadas.

Otras experiencias, debidas a Gurdon, confirman la idea de que la maduración es una etapa en la que las actividades sintéticas del oocito se modifican cualitativamente: mientras que el oocito está orientado hacia la síntesis de ARN, el huevo en vía de maduración se prepara para la síntesis del ADN. Si se inyectan núcleos de órganos adultos (hígado, cerebro) que no sintetizan normalmente ADN en un oocito en vía de maduración, se observa hinchazón de los núcleos (debida a la penetración de proteínas citoplásmicas), detención de la síntesis de los ARN y, por último, la puesta en marcha de una síntesis de ADN; ésta puede conducir a la entrada en mitosis de los núcleos inyectados. Es, pues, del estado del *citoplasma* del huevo, de lo que depende la elección entre las dos actividades principales del núcleo: síntesis de ARN o replicación del ADN.

Sobreviene la fecundación

La función del huevo y del espermatozoide tiene numerosas consecuencias importantes desde el punto de vista biológico: el número de cromosomas se hace de nuevo diploide; el huevo fecundado (cigoto) posee a la vez los caracteres hereditarios paterno y maternos; el sexo del futuro adulto se establece a menudo desde este momento.

Desde el punto de vista morfológico, el cambio más chocante es el levantamiento de una *membrana de fecundación* (fig. 11) y la *fusión de los dos pronúcleos* (núcleos haploides del huevo y del espermatozoide). El levantamiento de la membrana que atenazaba al huevo le permite dar vueltas libremente bajo la influencia de la gravedad: el pesado polo vegetativo se orienta hacia abajo, el polo animal hacia arriba. Es esta *rotación de orientación*, como ha demostrado Ancel y Vintemberger, lo que provoca la aparición del creciente gris (fig. 4) en los anfibios. Desde este momento, las coordenadas del embrión y del adulto están fijadas: el polo animal marca la cabeza y el creciente gris, el dorso: el plano que corta el creciente gris en dos mitades iguales constituye el *plano de simetría bilateral*, que separa las mitades derecha e izquierda del adulto. Todos estos cambios, en extremo importantes para la continuación del desarrollo, se producen en el citoplasma y no existe ninguna razón para pensar que estén bajo cualquier control genético. Además, el núcleo del huevo fecundado no sintetiza ARN en cantidades mensurables; por el contrario, se produce casi inmediatamente (en algunos minutos) una replicación de su ADN hecha posible por las síntesis proteicas que hayan marcado la maduración.

En el caso de muchas especies animales, pero sobre todo del erizo de mar, la fecundación se acompaña con una intensa *estimulación de la respiración celular y de la síntesis de las proteínas*. Esta última no es debida a la producción de nuevas moléculas de m-ARN, sino al enlace de m-ARN preformado, de origen materno y acumulado en el citoplasma del huevo con los ribosomas que se han producido en masa durante la oogénesis. Parece que los ribosomas del huevo virgen de erizo de mar sean anormales: estarían recubiertos por un inhibidor de naturaleza proteica que les impediría combinarse con los m-ARN citoplásmicos. Una de las consecuencias importantes y precoces de la fecundación sería la destrucción de este inhibidor. El papel del núcleo y de los genes en esta estimulación inicial de la síntesis proteica parece nulo: la misma síntesis de proteínas se observa, en efecto, incluso en ausencia del núcleo celular.

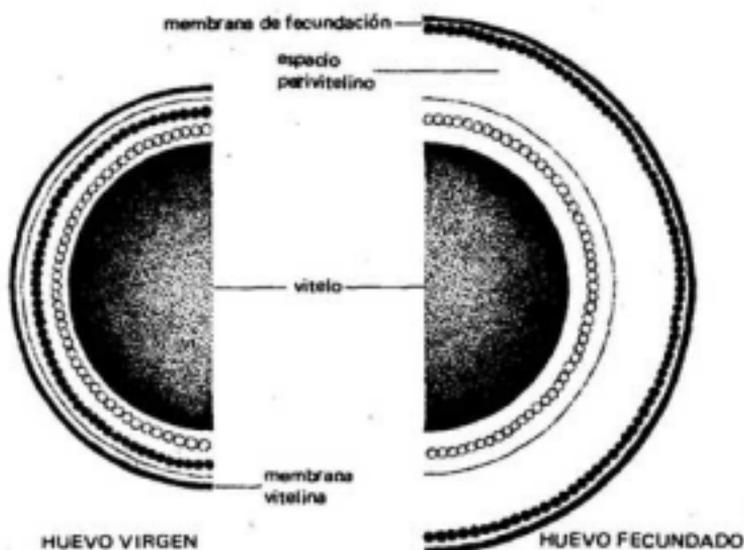


Figura 11. La fecundación tiene numerosas consecuencias importantes que resultan, a más o menos largo plazo, de la penetración del núcleo del espermatozoide en el huevo. Sin embargo, la reacción inmediata más chocante afecta a la superficie del huevo durante la fecundación: se ve, a la izquierda, un esquema de la membrana y del córtex de un huevo de erizo de mar virgen y, a la derecha, las estructuras correspondientes en un huevo recientemente fecundado (según J. Runnström). El cambio más importante es el levantamiento de la membrana de fecundación, que permite al huevo orientarse siguiendo la gravedad (el polo animal mirará hacia arriba y el polo vegetativo hacia abajo). Esta rotación de orientación provoca, en el huevo de rana, la aparición del creyente gris (ver fig. 4) que marca el dorso del futuro embrión. La reacción del córtex del huevo puede también ser provocada por agentes químicos o físicos (activación partenogénica): señala el despertar del huevo virgen, que estaba inerte, tanto en lo que concierne al desarrollo embrionario como a la actividad bioquímica (estimulación de la respiración y de la síntesis de proteínas, especialmente).

El huevo fecundado empieza a dividirse: segmentación

A la fecundación del huevo siguen divisiones celulares repetidas: los blastómeros se hacen cada vez más pequeños hasta el momento en que se alcanza la fase de blástula. Este período del desarrollo se caracteriza por una replicación rapidísima del ADN, sin duda tan rápida como la de las bacterias. La síntesis de los ARN se limita a la producción de una pequeña cantidad de m-ARN; no hay formación de rARN durante la segmentación,

salvo en los mamíferos en los que el almacenamiento de ribosomas presente en el huevo virgen es mucho menos importante que en otra parte. La ausencia de nucléolos hasta la fase blástula avanzada va a la par de la represión de los genes ribosómicos. En cuanto a los mRNA producidos durante la segmentación, no juegan por supuesto un papel importante durante esta fase del desarrollo. En efecto, se puede suprimir completamente su síntesis tratando los huevos fecundados con actinomomicina: el desarrollo necesario es normal hasta el fin de la segmentación; pero la etapa siguiente del desarrollo, la gastrulación, no se inicia. Hay que deducir que los mensajeros sintetizados durante la segmentación no son necesarios hasta el momento de la gastrulación. Por el contrario, un tratamiento de los huevos por inhibidores de la síntesis proteica bloquea casi inmediatamente la segmentación: ésta requiere, pues, la síntesis de nuevas proteínas (en particular la de la tubulina que entra en la composición del huso y de los ásteres); pero no necesita la síntesis de ARN.

Estos datos bioquímicos encuadran perfectamente con las experiencias embriológicas que muestran que, durante la segmentación, la importancia del citoplasma (donde se hace la síntesis de las proteínas) es superior a la del núcleo (base de la síntesis del ARN). En esta fase, la destrucción de localizaciones germinales citoplásmicas y la punción del córtex del creciente gris ejercen efectos profundos sobre la diferenciación del embrión. El material gelatinoso extracelular que une los blastómeros (cemento intercelular) tiene también su importancia para la morfogénesis: si se le añade a los huevos fecundados, su desarrollo se bloquea en la fase blástula. Podría suceder que este material interviniera en la experiencia de Driesch sobre la regulación embrionaria en el erizo de mar (ver más arriba): es lógico que los blastómeros separados, libres del cemento intercelular, tengan un desarrollo superior al que habrían tenido *in situ*, si este cemento ejerce un efecto inhibitorio sobre el desarrollo.

La formación de tres capas celulares y la inducción del sistema nervioso siguen a la segmentación

La *gastrulación* es un proceso complejo que transforma la blástula en una larva aún indiferenciada (la *gástrula*), pero que posee ya las tres capas celulares (ectodermo, mesodermo y endodermo) de las que todos los órganos del adulto provienen. *A grosso modo*, el ectodermo dará origen a la piel y al sistema nervioso; el cordomesodermo dará la *chorda*, los

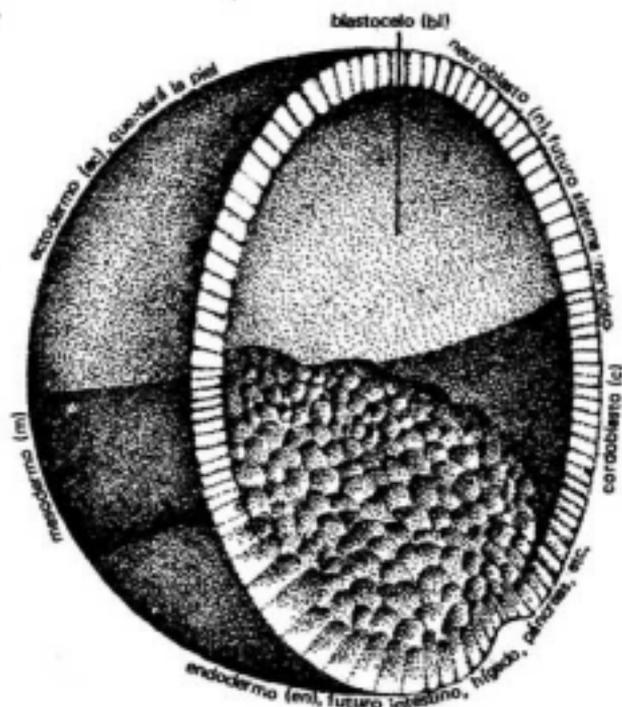


Figura 12. Gastrulación. Corte a través de una joven gástrula (compárese con la figura 3, en la que el huevo se veía desde el exterior). El embrión contiene una cavidad central, el blastocelo (*bl*). El territorio *c* (cordoblasto) es particularmente importante; corresponde al creciente gris del huevo fecundado y juega el papel de organizador: bajo su dirección, del territorio *n* nacerá el sistema nervioso. Como en la figura 3, *ec* corresponde al ectoblasto (que dará la piel), *m* al mesoblasto (futuros músculos, huesos, riñones, glóbulos rojos, etc.) y *en* al entoblasto (que proporcionará el intestino, el hígado, el páncreas, etc.). La gastrulación es un período caracterizado por movimientos celulares intensivos, que permiten que se coloquen en lugar correcto los diversos presuntos territorios. También es el momento en el que los genes comienzan a volver a ser activos; esta actividad se traduce en la producción de especies nuevas de ARN mensajeros.

músculos, el esqueleto, los riñones, los glóbulos rojos; el intestino, el hígado y el páncreas se diferenciarán a expensas del endodermo.

La gastrulación es un periodo en el que los *movimientos celulares* predominan sobre la actividad mitótica; estos movimientos se realizan gracias a la deformación de moléculas contráctiles muy parecidas a las que dan su contractilidad al corazón y a los músculos. La gastrulación marca también el principio de la desrepresión de los genes: en los núcleos se sintetizan nuevas especies de mensajeros, que no existían antes y que son indispensables en la gastrulación misma y para la continuación del desarrollo. Los genes ribosómicos salen, ellos también, de su letargo: los nucléolos hacen su aparición y se forman nuevos ribosomas.

A la gastrulación sigue la *neurulación*, que es dominada por la formación del sistema nervioso a expensas del ectodermo. Si se recortan fragmentos de ectodermo en la fase gástrula y se les cultiva *in vitro*, no forman más que una epidermis atípica y mal diferenciada. Si se añade a tales fragmentos ectodérmicos un poco de cordomesodermo, tomado igualmente de una gástrula, se transforman en sistema nervioso: esto resulta de una *inducción*, provocada por un factor presente en el cordomesodermo. Es muy probable que este factor sea una proteína específica, que se difunde del cordomesodermo hacia el ectodermo.

Otra proteína, que ha sido purificada, ejerce otro efecto totalmente distinto: transforma el ectodermo en mesodermo, de tal manera que los fragmentos ectodérmicos se diferencian en músculos, cartilago, etc. Estas proteínas preexisten ya en la gástrula y no sería sorprendente que estuviesen presentes ya en el oocito. No obstante, la inducción del sistema nervioso se acompaña también de una desrepresión de los genes, y los mensajeros que se sintetizan en este momento son necesarios para que las células ectodérmicas puedan reaccionar al estímulo inductor. Si la síntesis de los ARN está bloqueada por la actinomicina, no se observa ninguna disminución del poder inductor del cordomesodermo, que contiene ya las proteínas inductoras; pero la actinomicina anula, rápida y completamente, la capacidad de las células ectodérmicas para reaccionar al efecto inductor de las proteínas inductoras.

Producto de los genes del núcleo, la morfogénesis está modulada por el citoplasma

Hemos visto más arriba que se producen, durante todo el desarrollo embrionario, interacciones entre el núcleo y el citoplasma: si éste juega un

papel predominante en el transcurso de las primeras etapas del desarrollo, la importancia de los genes se hace evidente desde la gastrulación y se afirma cada vez más cuando las células de los diversos tejidos se diferencian. Proteínas sintetizadas en el citoplasma ejercen sin lugar a duda un control sobre la actividad de los genes; al principio del desarrollo, la síntesis de estas proteínas está codificada por los mensajeros estables, preexistentes, de origen materno.

Cabe preguntarse si las partículas *citoplásmicas* que contienen ADN (mitocondrias, cloroplastos) juegan un papel, importante o menos, en la morfogénesis. Se puede responder a la pregunta utilizando un método radical: quitar el núcleo a un organismo unicelular y ver lo que ocurre.

Se han hecho experiencias de *enucleación* con huevos de diversas especies y con organismos unicelulares: nunca la ablación del núcleo viene seguida por la muerte rápida del citoplasma, ni siquiera por la pérdida inmediata de sus actividades. Nos limitaremos aquí a un breve resumen de nuestros conocimientos sobre los dos sistemas biológicos que han sido mejor estudiados: el huevo del erizo de mar y el alga unicelular gigante *Acetabularia*.

Pueden obtenerse con facilidad fragmentos anucleados centrifugando huevos vírgenes de erizo de mar. Estos fragmentos responden a los agentes partenogenéticos con segmentaciones repetidas. Pero del desarrollo nunca va más allá: la información que posee el citoplasma anucleado se limita por tanto a la posibilidad de algunas divisiones celulares, fatalmente abortivas.

Los fragmentos anucleados contienen mensajeros de origen materno que les permiten responder a un estímulo partenogenético con una gran síntesis de proteínas. Entre estas proteínas está la tubulina, constitutiva de los ásteres que aseguran la segmentación del citoplasma anucleado. Pero los fragmentos anucleados también contienen numerosas mitocondrias, orgánulos responsables de las oxidaciones celulares; cada una de ellas posee ADN. Tras activación partenogenética, este ADN se hace funcional y se sintetizan los ARN mitocondriales. Pero el hecho de que el desarrollo de los fragmentos anucleados activados esté, en suma, muy limitado muestra que los ADN y ARN mitocondriales no pueden jugar más que un papel biológico reducido. Además, parece claro que las mitocondrias son incapaces de replicar su ADN en los fragmentos anucleados de los huevos de erizo de mar: su autonomía de cara al núcleo se limita así a la síntesis de los ARN mitocondriales y quizás de algunas proteínas mitocondriales.

La *Acetabularia*, alga unicelular gigante (5 cm de longitud), puede

cortarse fácilmente en dos: los dos fragmentos son capaces de regenerar y formar una estructura compleja, el "sombbrero" o umbrela (fig. 1). Experiencias de injerto han mostrado claramente que la formación del sombrero está controlada por "sustancias morfogenéticas" producidas por los genes del núcleo y no por el ADN de los cloroplastos o de las mitocondrias (Hämmerling).

Los fragmentos anucleados son asimismo capaces de sintetizar numerosas proteínas, entre ellas enzimas específicas. Estas experiencias (y muchas otras que no pueden resumirse aquí) han llevado a la conclusión de que la sustancias morfogenéticas son en realidad una familia de ARN mensajeros; producidos por el núcleo, podrían "sobrevivir" en el citoplasma anucleado durante semanas, incluso meses.

La *Acetabularia* contiene millones de cloroplastos, cada uno de los cuales lleva ADN. Estos cloroplastos tienen una amplia autonomía de cara al núcleo: pueden replicar su ADN, multiplicarse, sintetizar ARN y proteínas cloroplásticas en ausencia del núcleo. Pero esta autonomía dista mucho de ser completa: algunas enzimas presentes en los cloroplastos son sintetizadas por los genes nucleares; la multiplicación de los cloroplastos, en ausencia del núcleo, es lenta y cesa tras algunos días. Finalmente, experiencias hechas con venenos que afectan preferentemente a la síntesis de los ADN cloroplásticos y mitocondriales han llevado a la conclusión de que no son éstos los que dirigen la regeneración y formación de los sombreros. La morfogénesis es, por tanto, obra de los genes nucleares que actúan por medio de mensajeros estables.

El conjunto de estas investigaciones permite concluir que no se puede explicar la morfogénesis por intervención de plasmagenes. Las experiencias de que hablaremos a continuación no harán sino reafirmar esta conclusión.

Los métodos clásicos de la genética (hibridación, aislamiento de mutantes) son preciosos para analizar el papel de los genes en la diferenciación celular

Nuestros conocimientos en este importante campo son por desgracia aún muy limitados. Cuando se fecundan huevos de erizo de mar por espermatozoides de otra especie, los híbridos son frecuentemente *letales*: mueren ya sea al comienzo de la gastrulación, ya sea en un estado larvario más tardío. En este último caso, los caracteres paternos aportados por el

espermatozoide no se manifiestan hasta después de la gastrulación. Estos hechos confirman que no es sino en este estadio cuando los genes llegan a ser realmente activos. En el caso de los híbridos letales precoces, puede mostrarse que se produce una síntesis excesiva de *mensajeros paternos*: los mecanismos de control, que limitan normalmente la transcripción del ADN, resultan, por tanto, ineficaces cuando se trata de la transcripción de un ADN extraño. Estos mismos híbridos sintetizan cantidades apreciables de *proteínas paternas* y puede pensarse que la letalidad se debe a la acumulación de estas proteínas extrañas al citoplasma, que es de origen exclusivamente materno.

Ciertas *mutaciones* que detienen el desarrollo en una fase precoz presentan gran interés. Hemos hablado ya de la mutación *nu-o* en el *Xenopus*: después de una delección de organizadores nucleolares (con pérdida del r-ADN), son incapaces de formar nucléolos y sintetizar los r-ARN. El mutante (o) del ajolote es letal, en el estado homocigótico, desde la gastrulación; pero el desarrollo se hace normal si se inyecta, en los huevos fecundados del mutante, el jugo nuclear de un oocito normal. Los factores que están presentes en el núcleo del oocito y que son capaces de corregir la mutación (o) son probablemente proteínas sintetizadas bajo la dirección de cromosomas plumosos.

La existencia de letales precoces, después de la hibridación o a continuación de una mutación, demuestra claramente la necesidad de una constitución genética normal para que el desarrollo sobrepase la gastrulación.

El problema de la diferenciación celular se remite al del control de la actividad genética

Cuando el sistema nervioso se forma, después de una inducción, no posee aún células nerviosas (neuronas) diferenciadas desde el punto de vista morfológico, fisiológico y bioquímico: *la diferenciación celular* tiene lugar después de *la organogénesis* con un retraso de algunos días. La figura 13 da un ejemplo de diferenciación celular: se ve, de un lado a otro, células musculares y cartilaginosa; tienen el mismo origen embriológico (mesodérmico), pero las primeras presentan una estriación característica debida a la presencia de proteínas contráctiles (actina y miosina), mientras que las segundas están rodeadas de una matriz homogénea formada por azúcares y proteínas (condroproteínas).

La naturaleza de los factores, genéticos y otros, que controlan la diferenciación celular sigue siendo uno de los problemas de la biología moderna. El enigma se ha hecho aún más oscuro por el hecho que nosotros sabemos, después de las experiencias de Gurdon (fig. 6), que todos los núcleos de las células diferenciadas poseen los mismos genes que el huevo fecundado. No hay pues diferencia genética fundamental entre las células musculares y cartilagosas representadas en la figura 13. Sin embargo, sintetizan proteínas diferentes: hay que admitir, por tanto, que la síntesis de la actina y de la miosina está reprimida en las células cartilagosas, mientras que la de las condroproteínas no se produce en las células musculares. El problema de la diferenciación celular se remite, pues, esencialmente al del *control de la actividad genética*; ¿por qué los genes de las condroproteínas están reprimidos en una célula muscular, mientras que se expresan en una célula cartilaginosa? Se piensa, actualmente, que este control de la actividad genética lo realizan las proteínas (básicas y no básicas) asociadas a los cromosomas. Es muy probable, pero los experimentos absolutamente decisivos aún faltan.

Esperando que el futuro traiga una solución al complejo problema de la regulación de la actividad genética en las células en vía de diferenciación, cabe decir algunas palabras sobre los sistemas biológicos prometedores para el estudio experimental de la diferenciación celular. El más natural de estos sistemas es el embrión mismo, pero la existencia de gradientes morfogenéticos, de fenómenos de regulación embrionaria y de inducción complica el análisis experimental. Por esto muchos investigadores prefieren trabajar con células embrionarias cultivadas *in vitro*.

Entre los numerosos experimentos que se hacen actualmente con estas células, hay dos que merecen un interés muy particular. En primerísimo lugar, los experimentos de *fusiones celulares*, que permiten realizar los *híbridos somáticos*. Si, como lo han hecho Ephrussi y sus colaboradores, se fusiona una célula diferenciada (una célula pigmentada, una célula nerviosa o una célula hepática, por ejemplo) con una célula embrionaria aún indiferenciada, la diferenciación se pierde enseguida: el pigmento o las proteínas características del sistema nervioso o del hígado cesan de sintetizarse. El citoplasma de la célula indiferenciada ejerce, pues, un *control negativo*: reprime la síntesis de las proteínas específicas, características de la célula diferenciada. La interpretación de estas interesantes experiencias es, desgraciadamente, un poco complicada ya que los híbridos somáticos (como por otra parte los híbridos entre erizos de mar de los que hemos hablado antes) tienden a perder una parte de sus cromosomas en el citoplasma.



Figura 13. Ejemplo de diferenciación celular en el transcurso del desarrollo embrionario: formación de células cartilaginosas (c) y musculares (m) en un joven renacuajo de rana. Las células cartilaginosas están situadas en celdillas (flechas) rodeadas por una matriz homogénea formada por condroproteínas. Las células musculares están formadas por fibrillas alargadas. La diferenciación embrionaria no ha terminado aún en esta fase del desarrollo: las células cartilaginosas se transformarán ulteriormente en células óseas; las fibras musculares no poseen aún la estriación característica representada en la figura 2. Las células cartilaginosas y musculares tienen el mismo origen embriológico (mesodermo) y poseen los mismos genes; son, no obstante, morfológica y bioquímicamente diferentes. El problema de la diferenciación celular se remite al del control de la actividad de los genes; su solución debería permitir hacer grandes y rápidos progresos en el dominio de la oncología.

El otro tipo de experimento es muy diferente, pero conduce al mismo resultado: la pérdida de la diferenciación celular. Si se le añade a estas células en vía de diferenciación *bromodeoxitridina* (BUDR), se detiene selectivamente la diferenciación. Células bien diferenciadas incluso pueden perder su diferenciación y volver a un estado indiferenciado. Por ejemplo, las células musculares embrionarias no forman proteínas contráctiles en presencia de BUDR; en estas condiciones las células cartilaginosas no sintetizan condroproteínas y la producción de pigmento es impedida en

las células pigmentadas. Tratando un embrión muy joven de pollo con BUDR, se impide selectivamente la síntesis de hemoglobina y la formación de glóbulos rojos. La BUDR reacciona, en la mayor parte de los casos, modificando el ADN: en efecto, esta sustancia es un "análogo" de la timidina, precursor natural del ADN. Los efectos de la BUDR (que reacciona, además, probablemente también sobre las membranas celulares) impiden selectivamente la síntesis de las proteínas específicas de células diferenciadas (*proteínas de lujo*, de Holtzer) sin afectar a la de las proteínas comunes, presentes en toda célula (*proteínas caseras* de Holtzer)

Holtzer sugirió la posibilidad de que la BUDR impediría la *amplificación* de los genes responsables de la síntesis de las "proteínas de lujo": estos genes existirían bajo la forma de un mayor número de copias en las células que van a sintetizar la proteína específica de su tejido. Pero observaciones recientes tienden a demostrar que no hay amplificación de genes de la hemoglobina en las células madres de los glóbulos rojos: su número (probablemente cuatro) es el mismo que en todas las demás células.

El modo de acción de la BUDR queda, pues, oscuro; pero no por ello queda menos claro que esta sustancia constituye un preciosísimo utensilio para el análisis de la diferenciación celular.

De la ficción a la realidad

Los que han tenido la ocasión de seguir de cerca el desarrollo de la embriología molecular en el transcurso de los 40 últimos años sin duda estarán maravillados por el gigantesco progreso que ha tenido lugar. Es cierto que viejos problemas de otros tiempos continúan planteándose a la embriología de hoy, pero de forma mucho más concreta. Ya Buffon y sus contemporáneos discutían la importancia relativa de la "preformación" y de la "epigénesis" durante el desarrollo embrionario. Hoy la preformación corresponde al almacenamiento de moléculas informativas acumuladas durante la oogénesis; la epigénesis corresponde a la adquisición de informaciones nuevas, después de una activación secuencial y selectiva de genes determinados.

Sería en vano querer jugar al profeta e intentar predecir lo que será el porvenir de la embriología molecular y lo que aportará a la humanidad. Se puede pensar, sin embargo, sin gran riesgo de equivocarse que aportará contribuciones importantes a dos problemas que preocupan al hombre de

hoy: el cáncer y las *enfermedades hereditarias*. El cáncer es una enfermedad celular caracterizada por la ausencia de diferenciación; cuando comprendamos mejor los mecanismos de la diferenciación celular, podremos buscar, de manera lógica, armas contra el cáncer: quizás fuera mejor intentar forzar las células cancerosas a diferenciarse que intentar matarlas, como se hace hoy.

En cuanto a las enfermedades hereditarias, se puede esperar corregirlas introduciendo, en el huevo o en el embrión, el ADN normal: la cosa debería intentarse, sobre el plano experimental, en el caso de las *hemoglobinopatías*, en donde se forman unas hemoglobinas anormales. En efecto, ya podemos aislar el mensajero de la hemoglobina humana y actualmente los esfuerzos se encaminan a sintetizar el gen correspondiente partiendo de este mensajero.

Quizás no sean más que sueños; pero el pasado reciente de la embriología molecular muestra claramente que la realidad superará pronto lo que nos parece aún que no es más que una ficción.

La Recherche, enero 1973

9. EL ORIGEN DE LA VIDA

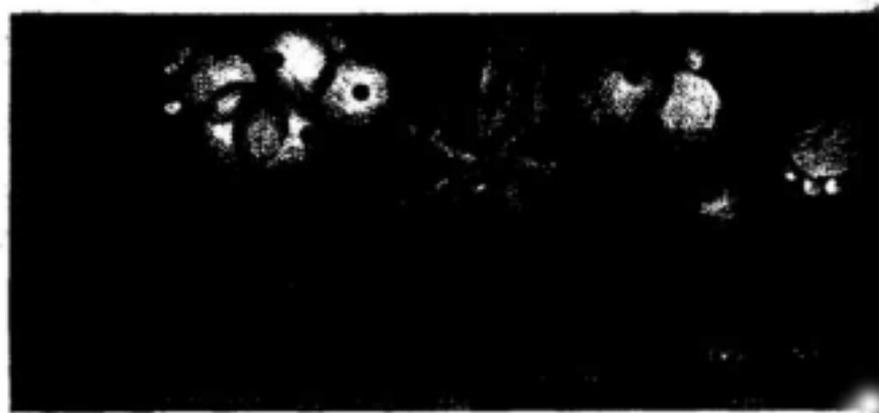
Melvin Calvin

¿Cómo nació la vida? Esta pregunta es evidentemente la más importante que los hombres se hayan hecho desde que se han interesado por su origen, y muchas hipótesis se han avanzado ya. Mi finalidad, en este artículo, es exponer cuáles son los puntos de vista actuales y qué respuesta puede darse en nuestra época, teniendo en cuenta los progresos de la ciencia moderna, en el cuadro de las leyes naturales que nosotros conocemos.

Ya se puede encontrar la idea fundamental de un origen único en los escritos de Charles Darwin. Si dos individuos de una misma especie son separados y su apareamiento se hace imposible, pueden poco a poco dar origen a variedades distintas de una misma especie; más aún, si son mantenidos bastante alejados para no poderse cruzar nunca, se transformarán eventualmente, por modificaciones ulteriores, en especies diferentes incapaces de fecundarse la una a la otra. Volvamos a tomar esta idea de Darwin y remontémonos a sus fuentes: si tomamos dos especies vecinas, pero diferentes, se harán más próximas a medida que nos remontemos en el tiempo. Se debe poder alcanzar así un punto de partida *único*. A éste apuntamos nosotros cuando hablamos del "origen" de la materia viva. Nuestro problema es alcanzar este punto a partir de lo que sabemos sobre atmósferas terrestres e interestelares. Ya Darwin había expresado esta idea en una carta: "Creo haber dicho en alguna parte (pero no encuentro ya el pasaje) que el principio de continuidad hace probable el hecho de que la vida sea parte, o consecuencia, de una ley general". El pasaje que Darwin había olvidado, y que data de 1871, es el siguiente: "Se dice frecuentemente que las condiciones necesarias para la aparición de los primeros organismos vivos se cumplen en el presente y que siempre se han cumplido. Pero sí (¡y qué gran sí!) se puede imaginar que, en algún mar caliente dotado de todo tipo de sales amoniacales y fosfóricas, en presencia de calor, luz y electricidad, etc., haya podido formarse químicamente un



Figura 1. Las épocas de la evolución: la evolución química comienza con la formación de la Tierra hace algo menos de 5 mil millones de años. La evolución biológica comienza alrededor de mil millones de años más tarde. La historia de la



compuesto proteico capaz de soportar modificaciones complejas, tal compuesto sería, en nuestros días, instantáneamente devorado o absorbido, lo que no ha podido ser el caso antes de la formación de los seres vivos".

Darwin era un hombre perspicaz: podía ver no sólo lo que era posible, sino también sus propios límites y sobre todo los de la ciencia en su época. Los datos acumulados desde hace cien años sobre lo que son las moléculas y sobre las leyes que presiden su transformación nos permiten en el presente reproducir en el laboratorio algunos acontecimientos que



Tierra no la cuentan bien los fósiles más que de 600 millones de años aquí, aproximadamente. (*Leer estos documentos de izquierda a derecha y a continuación uno de otro*).



sucedieron al principio de la historia de la Tierra, según un esquema que Darwin mismo trazó más o menos.

La evolución química ha hecho aparecer las estructuras necesarias para la manifestación de la vida

Para trazar de nuevo la continuación de los acontecimientos después del principio de la Tierra —hace alrededor de 4,7 mil millones de años— hasta la llegada del primer elemento organizado que se pueda calificar de

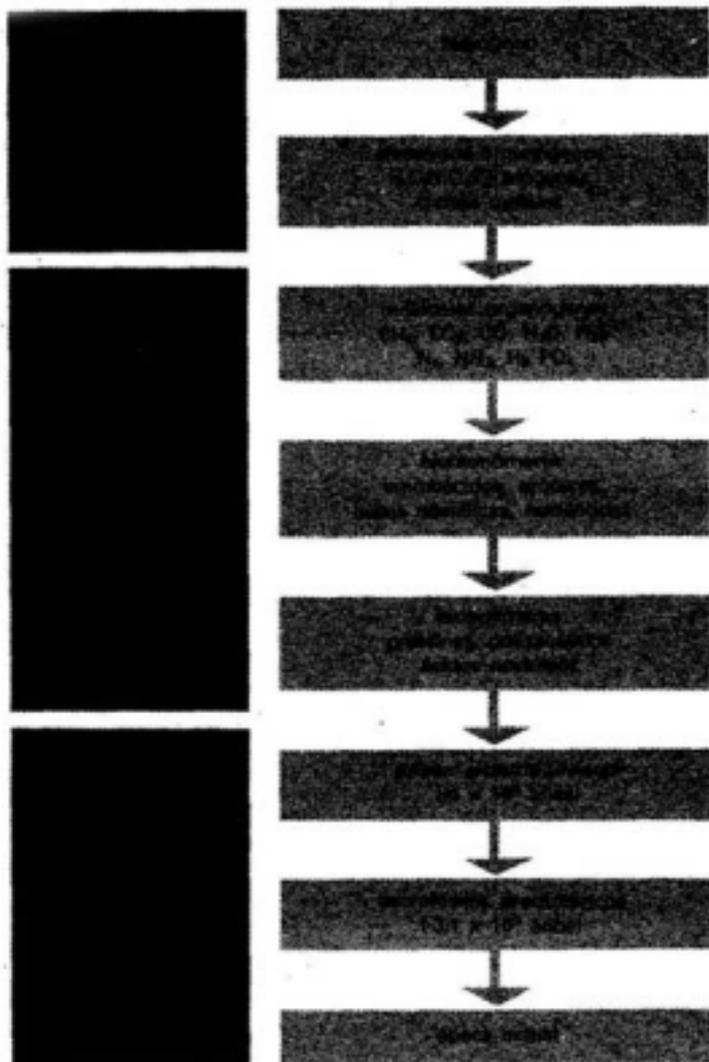


Figura 2. La evolución química condujo de los elementos más sencillos del dominio interestelar, hidrógeno, carbono, etc. a los biopolímeros complicados, proteínas, ácidos nucleicos, etc., que constituyen la materia viva. Las fases intermedias fueron la formación de los biomoléculas sencillas, aminoácidos, nucleótidos, a partir de pequeñas moléculas que constituyeron la atmósfera primitiva: CO₂, agua, etc.

"vivo", debemos buscar algunos puntos de partida. Vamos a desarrollar aquí lo que sabemos del sistema solar y de cómo se formó la atmósfera planetaria. Una vista de la Tierra tomada por un satélite a cerca de 480.000 km de distancia muestra bien la naturaleza de la "bola" sobre la que vivimos. Se la ve revestida por su atmósfera actual, muy delgada con relación al tamaño del globo. No tiene la misma composición que la atmósfera primitiva de la Tierra. Esta última, constituida por hidrógeno, metano y amoníaco, desapareció y una segunda atmósfera se formó a partir de gases nacidos de la Tierra misma. Hablaremos más adelante de estos gases y de cómo, de hecho, han podido ser en los orígenes compuestos biológicamente importantes, necesarios para la aparición de la vida.

Pero antes, resumamos brevemente lo que sabemos de la historia geológica de la Tierra (fig. 1). Los fósiles no permiten remontarse más que hasta los 600 millones de años; se empieza justo ahora a descubrir y a reconocer fósiles de épocas anteriores. Se acaban de identificar en las rocas antiguas microfósiles de algas y de bacterias que se estima aparecieron hace alrededor de 3,5 mil millones de años. La "evolución biológica" tuvo lugar durante este largo período que empieza hace alrededor de 4 mil millones de años y continúa aún en nuestros días. Anteriormente había transcurrido el período que cubre la "evolución química" (fig. 2). No sabemos realmente cuándo comenzó, pero las condiciones necesarias eran la presencia de una atmósfera y la formación de la Tierra misma, hace algo menos de 5 mil millones de años. Este período es el que estudiaremos aquí.

La evolución química comienza con la formación de moléculas sencillas a partir de elementos para convertirse en moléculas más complejas como los azúcares o los aminoácidos, que polimerizándose dan los biopolímeros. Algunas de estas transformaciones han sido simuladas en el laboratorio para intentar encontrar cómo pudieron producirse todos estos fenómenos. El fin era reconstruir esta "creación" en las condiciones que, se presume, existían hace 4,5 mil millones de años.

Se sabe que en el universo la mayor parte de los cuerpos están constituidos por hidrógeno y algunos otros elementos tales como carbono, nitrógeno, oxígeno y fósforo (a *grosso modo*, citados por orden de abundancia), que representan las materias importantes en la elaboración de los seres vivos. En las primeras fases de la evolución cósmica, los cuerpos celestes se formaron a partir del hidrógeno, y existen en ellos otros elementos más pesados que el carbono. La situación cambia totalmente después. No se trata ya de la transmutación del núcleo de un elemento en

otro, sino de una "atmósfera fría" en la cual los átomos pueden combinarse y enlazarse entre ellos. Así nacen unas moléculas (amoniaco, metano, hidrógeno, agua) a partir de las cuales se formará la atmósfera primitiva de la Tierra, que desapareció después.

Se supone que la atmósfera prebiótica surgió a partir del gas que se escapaba del interior de la Tierra, fenómeno que prosigue todavía actualmente. Estos están constituidos esencialmente de gas carbónico, óxido de carbono, sulfuro de hidrógeno y nitrógeno. Un problema se plantea: ¿cómo se puede reducir el carbono y el nitrógeno (es decir, obtener metano (CH_4) y amoniaco (NH_3)), a partir del carbono oxidado (carbono combinado con oxígeno) y nitrógeno molecular? El gas carbónico, el óxido de carbono, etc. han sido reducidos aparentemente por el hidrógeno, que no se quedaría en la atmósfera porque era demasiado ligero y escapaba a la gravitación terrestre. Recordemos que uno de los argumentos avanzados era que el hidrógeno resultaba indispensable para que aparecieran las moléculas participantes en la creación de la vida. De alguna manera es un "círculo vicioso". Con lo que se conoce de las condiciones terrestres actuales, la creación de la vida necesitaría tres etapas. La evolución química comienza por la formación de biomonómeros a partir de pequeñas moléculas orgánicas. Los biomonómeros son a su vez pequeñas moléculas que deben enlazarse unas a otras en largas cadenas (biopolímeros) para fabricar la "sustancia" de la materia viva. En los orígenes, los biomonómeros debieron formarse de manera abiogénica (en ausencia de toda vida); después se formaron los biopolímeros, de los que enseguida nacieron las membranas y los primeros sistemas vivos, fenómeno que debió producirse hace alrededor de 4 mil millones de años.

Varias hipótesis se han avanzado para explicar la formación de biomonómeros. ¿Cuáles son las moléculas de partida? Sin duda el metano, el amoniaco, el hidrógeno y el vapor de agua, que son el principio de aminoácidos y azúcares, de los que ciertos fragmentos pueden dar ácidos nucleicos (constituyentes del material genético), polisacáridos y cuerpos grasos (componentes de las membranas celulares).

Las primeras etapas de la creación de la vida han podido ser reproducidas en laboratorio

Se han imaginado en el laboratorio diferentes caminos de formación. El principal, propuesto a mediados del siglo xx, fue experimentado

con éxito en 1950 en Berkeley, en nuestro laboratorio. Se partió de moléculas primitivas (CO , CO_2 , H_2O , NH_3 , H_2 , CH_4), irradiándolas con diferentes fuentes de energía intensa: radiaciones solares ultravioleta, radiaciones ionizantes procedentes de los materiales radiactivos de la corteza terrestre, rayos cósmicos y finalmente una forma de energía solar, debida al recalentamiento de la atmósfera que hace fluir los gases unos con relación a otros creando electricidad estática y relámpagos. Las moléculas así irradiadas y los átomos libres que se forman después de la ruptura de los enlaces se combinan enseguida. Las leyes de recombinación dependen intrínsecamente de los átomos y no del azar, lo que se comprueba constatando que los átomos de carbono se unen con cuatro átomos de

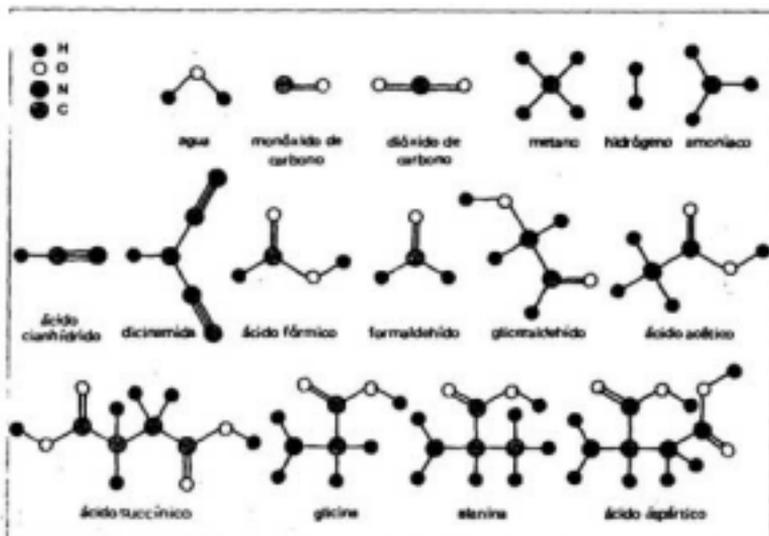


Figura 3. Se han imaginado, en laboratorio, numerosos métodos para obtener las moléculas primitivas en condiciones parecidas a las condiciones prebióticas. Por ejemplo, se hacen pasar descargas eléctricas, en una mezcla de gas elegido entre las moléculas que figuran en primera línea: agua (H_2O), óxido de carbono y gas carbónico (CO y CO_2), metano (CH_4), hidrógeno (H_2) y amoníaco (NH_3). En la primera línea inferior figuran algunos biomoléculas producidos durante estos experimentos: el ácido succínico y unos aminoácidos. Entre los dos se encuentran compuestos intermedios, moléculas que pueden después convertirse en productos de la tercera línea. Se han detectado, sin lugar a duda, algunas de estas moléculas en la atmósfera interestelar, lo que confirma el buen fundamento de estos experimentos.

hidrógeno, el nitrógeno con tres átomos de hidrógeno, etc. Las leyes de combinación (reglas de valencia) continúan aplicándose después de la ruptura de la molécula. Por eso es por lo que los nuevos enlaces así establecidos son estables durante mucho tiempo. Es exactamente lo que se produjo durante la experiencia de Berkeley en 1950. Las radiaciones producidas por un ciclotrón eran dirigidas sobre una mezcla de hidrógeno y de gas carbónico, con indicios de hierro y agua. Se obtuvieron algunos compuestos reducidos, entre ellos formaldehído, así como una serie de otros productos (ácido acético, ácido glicólico) (fig. 3). En estos experimentos no utilizamos ninguna fuente de nitrógeno. S. Müller, en la universidad de Chicago, en 1953, introdujo amoniaco en la mezcla, y aparecieron diferentes productos, entre ellos HCN (ácido cianhídrico), (fig. 4). Esta molécula particular contiene átomos cuyos niveles de energía son elevados: es decir, que la energía almacenada en las moléculas les permite ser la base de otros fenómenos químicos en un medio adecuado. Muchas otras moléculas primordiales pueden ser creadas a partir de HCN, y la operación se realizó a gran escala en condiciones simuladas, en el laboratorio.

Los organismos vivos se edifican a partir de compuestos situados en último lugar en la figura 3. Son aminoácidos que, enlazados entre sí de cierta manera, dan origen a las proteínas. El ácido acético (segundo lugar de la fig. 3) es el primer "lípidio" en el origen de las membranas celulares. Los hidratos de carbono (azúcares y celulosa vegetal) están compuestos generalmente de formaldehído polimerizado de diferentes maneras.

Acabamos de demostrar que era posible, con energía, transformar una atmósfera primitiva (línea superior de la fig. 3) en biomonómeros (última línea de la fig. 3). Los productos de la línea del medio son intermediarios, moléculas que están ahí temporalmente y pueden convertirse en moléculas de la fila inferior. Este hecho no es especulativo; sin embargo, un problema queda planteado: cuando se rompen las moléculas primitivas, se obtienen moléculas "útiles", situadas sobre la línea inferior de la figura 3, tanto si hay metano en la atmósfera como tan sólo en presencia de anhídrido carbónico. He aquí el "círculo vicioso": no es necesario que la atmósfera contenga metano para que cree una situación favorable a la aparición de la vida.

Las moléculas necesarias para la edificación de la materia viva existían ya en el medio interestelar

Después de haber creado los biomonómeros primitivos, se ha

verificado que era difícil obtener moléculas de la fila superior de la figura 3, en cantidad suficiente. Otra fuente posible de estas moléculas, propuesta hace poco, parece realmente interesante. Resultaría ser el espacio interestelar mismo, lugar que parece bastante poco adecuado para contener tan grandes moléculas. Hasta hace cuatro o cinco años, las únicas moléculas conocidas en el espacio interestelar eran fragmentos sencillos, tales como un átomo de hidrógeno enlazado a un átomo de oxígeno (radical hidroxilo), o un átomo de carbono unido a un átomo de nitrógeno (radical cianuro); todas eran moléculas incompletas, a las que se había observado en diferentes partes del cielo. Los astrónomos pueden estudiar este tipo de moléculas gracias a la luz absorbida o emitida cuando empiezan o terminan sus vibraciones. Los radicales cianuro e hidroxilo son considerados desde hace mucho tiempo como constituyentes del espacio interestelar. Sin embargo, desde estos últimos años, el desarrollo de la radioastronomía permite observar no sólo las vibraciones de la molécula (o de los fragmentos) sino también su rotación. Con los radiotelescopios regulados respecto a ciertas longitudes de onda, diversas moléculas biomonómicas importantes se han descubierto en el espacio interestelar.

Estas moléculas se han encontrado en todo el cielo, y en particular en la nebulosa de Orión (fig. 5). Si se la estudia cuidadosamente, se percibe una nube de moléculas emitiendo luz visible, detrás de la cual hay estrellas. La luz estelar pasa a través de la nube gaseosa de la nebulosa de Orión y puede servir de fuente para observar los diferentes tipos de luz captados por esta nube. Una zona de la nebulosa de Orión, estudiada con ayuda de radiofrecuencias, contiene mucho formaldehído (cuatro átomos: uno de oxígeno, uno de carbono y dos de hidrógeno), mientras que la región próxima del borde superior de esta misma nebulosa es más rica en óxido de carbono (CO).

En la figura 5 se presenta la lista de moléculas descubiertas en el espacio interestelar después de años de esfuerzos intensivos. Las moléculas más interesantes que se han encontrado son el cianógeno, C_2N_2 , y el mismo HCN. En 1970, el descubrimiento de cianoacetileno en el espacio interestelar ($H-C \equiv C-C \equiv N$) permitió concebir la formación de casi todas las materias de las que el organismo vivo tiene necesidad. Dotado de dos triples enlaces, el cianoacetileno es una molécula muy reactiva. Desde 1970, la lista de moléculas interestelares ha crecido, desde el cianoacetileno hasta el acetonitrilo (cianuro de metilo) que, como el metilacetileno, comprende un triple enlace. El acetaldehído, cuya molécula tiene siete átomos, fue descubierto en 1971. Realmente es una molécula

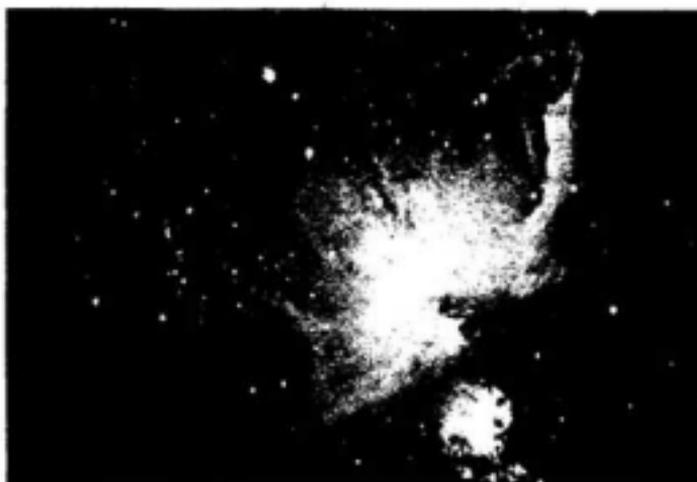


Figura 4. La nebulosa de Orión M 42 está constituida por una nube de moléculas que emite en la zona visible del espectro. A través de esta nube, se perciben estrellas que pueden jugar un papel de fuentes luminosas para analizar los gases de la nube. Una de las regiones de la nebulosa de Orión es rica en formaldéhidó, otra contiene óxido de carbono. Numerosas moléculas primitivas se han encontrado en el espacio interestelar. Así, todas las materias necesarias en la formación de los biomonómeros, o sea en el principio de la vida, se encontraban probablemente en el espacio en la formación de la Tierra. (Cliché H.A. Weaver, Dept. of Astronomy, University of California, Berkeley).

grandísima para el espacio interestelar y, cosa sorprendente, incluso en este medio tiene una duración de vida relativamente larga.

Después de estos descubrimientos, pretender hacer experimentos para simular la formación de biomonómeros no parece ya tan importante. Desde que se ha encontrado cianoacetileno en el espacio interestelar, estoy convencido de que la mayor parte, si no todas las sustancias necesarias para la formación de monómeros podían proceder del espacio exterior, después de la aparición de la Tierra. Estas moléculas pudieron ser absorbidas por el interior y volver a salir más tarde con el agua y otras materias. Dicho de otra manera, los materiales primarios, formados gracias a la energía interestelar, existían desde el comienzo, y no hay que preocuparse de la transformación en biomonómeros de la atmósfera primitiva.

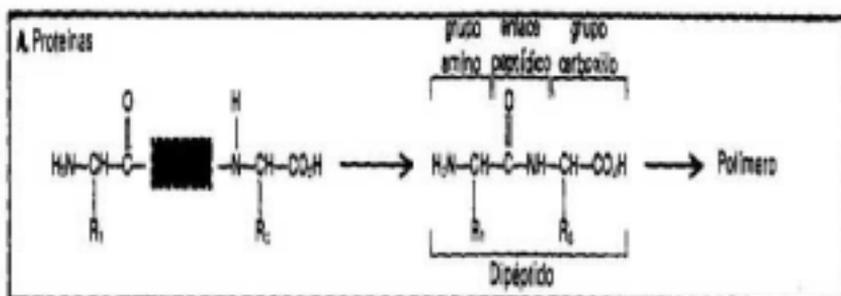
Año	Molécula	Símbolo	Longitud de onda
1937		CH	4.300 Å
1940	cianógeno	CN	3.875 Å
1941		CH	3.745-4.233 Å
1963	hidroxilo	OH	18; 6,3 ; 5,0, y 2,2 cm
1968	amoníaco	NH ₃	1,3 cm
1968	agua	H ₂ O	1,4 cm
1969	formaldehído	H ₂ CO	6,2; 2,1 y 1 cm; 2,1, y 2,0 mm
1970	monóxido de carbono	CO	2,6 mm
1970	cianógeno	CN	2,6 mm
1970	hidrógeno	H ₂	1.100 Å
1970	ácido cianhídrico	HCN	3,4 mm
1970	X-ogeno	?	3,4 mm
1970	cianoacetileno	HC ₃ N	3,3 cm
1970	alcohol metílico	CH ₃ OH	36 y 1 cm; 3 mm
1970	ácido fórmico	CH ₂ OOH	18 cm
1971	monosulfuro de carbono	CS	2,0 mm
1971	formamida	NH ₂ CHO	6,5 mm
1971	óxido de silicio	SiO	2,3 mm
1971	sulfuro de carbonilo	OCS	2,7 mm
1971	acetónitrilo	CH ₃ CN	2,7 mm
1971	ácido isocianico	HNCO	3,4 mm; 1,4 cm
1971	ácido isocianhídrico	HNC	3,3 mm
1971	metilacetileno	CH ₃ C ₂ H	3,5 mm
1971	acetaldehído	CH ₃ CHO	28 cm
1971	tioformaldehído	H ₂ CS	9,5 cm
1972	sulfuro de hidrógeno	H ₂ S	1,2 mm
1973	monóxido de azufre	SO	3 mm

Figura 5. El espacio interestelar contiene numerosas moléculas que pueden ser identificadas por las líneas espectrales que emiten o que absorben. Mientras que no disponían más que de espectrógrafos ópticos, los astrofísicos detectaron poco sobre las moléculas. Pero después del acontecimiento del espectroscopio de radiofrecuencias, que hacía posible la detección de líneas de mayor longitud de onda, los descubrimientos se han acelerado prodigiosamente. En este momento se descubren nuevas líneas, pero muchas de ellas no han podido identificarse aún.

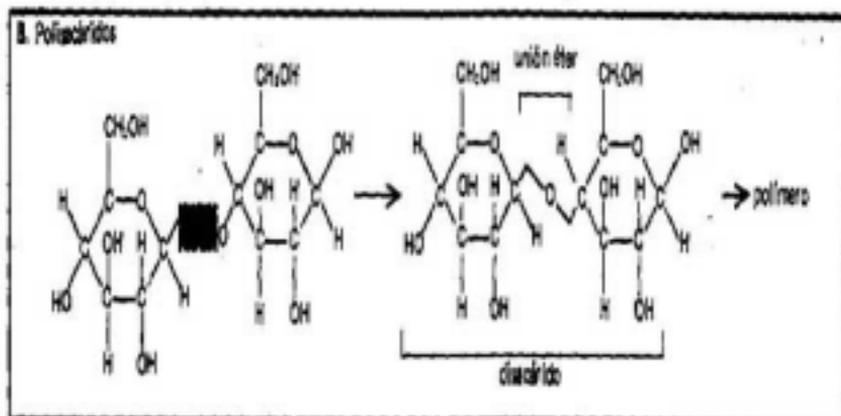
¿Cómo se han constituido los biopolímeros?

El desarrollo de la etapa siguiente es más difícil de dilucidar. ¿Cómo se unen entre sí los biomonomeros para constituir biopolímeros como las proteínas, por ejemplo? (fig. 6A). Dos aminoácidos pueden agruparse por

Figura 6. La formación de los biopolímeros resulta de la condensación de biomoléculas con eliminación de una molécula de agua en cada etapa.

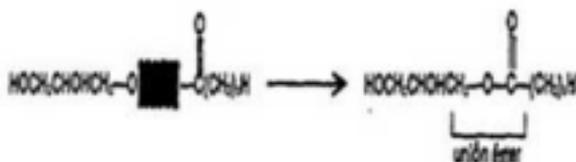


A. En el momento de la formación de proteínas, el agua proviene del grupo carboxilo de un ácido y del grupo amino de otro. Hay formación de un enlace amida. El dipéptido formado reacciona enseguida con otro aminoácido, y así sucesivamente.



B. La eliminación de agua entre dos moléculas de azúcar, con formación de un enlace éter, produce un disacrido, que puede a su vez, reaccionar con una tercera molécula de azúcar, etc.

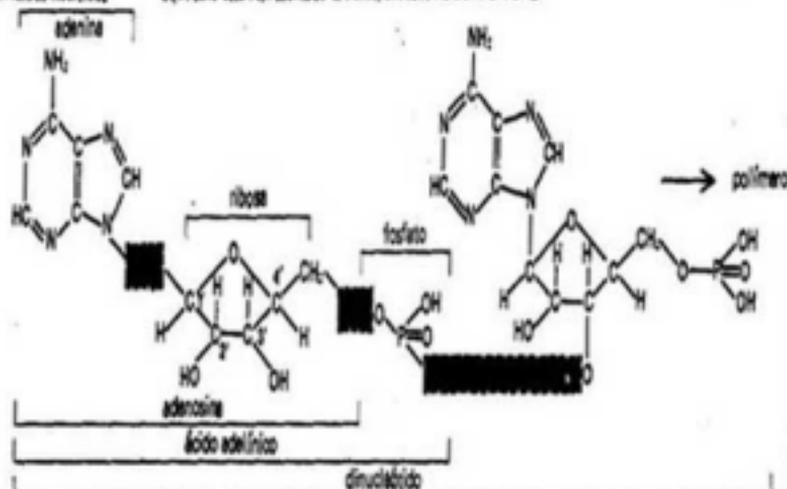
C. Lípidos



C. De esta manera también se forman los enlaces éster en los lípidos.

D. Ácidos nucleicos

aquí solo está representado el ARN; el ADN no tiene OH en 2'



D. La formación de ácidos nucleicos necesita la salida de tres moléculas de agua: dos para la formación del nucleótido (base + azúcar + fosfato) y la tercera para la formación del polímero.

pérdida de agua (deshidratación), habiéndose deducido el agua a partir del grupo carboxilo de uno de los ácidos y del grupo amino de otro. Resulta un dipéptido que, a su vez, puede reaccionar con otro aminoácido, y así sucesivamente. Se obtiene finalmente un polímero. Estos polímeros formados por aminoácidos son las proteínas. Por ejemplo, la insulina está formada por dos cadenas asociadas una a la otra; la primera comprende 30 unidades, la segunda 28. Bien conocida es también la ribonucleasa, enzima que rompe los ácidos nucleicos y se compone de 128 unidades. La hormona del crecimiento contiene alrededor de 150. La variedad de las proteínas es prácticamente infinita, y esto gracias a la existencia de veinte grupos R que pueden agruparse por centenas, formando largas cadenas.

Los mismos procesos de deshidratación tienen lugar durante la fabricación de otros biopolímeros. En la síntesis de los polisacáridos, son las moléculas de azúcar las que están implicadas. Lo mismo que para las proteínas, se puede ver en la figura 6B cómo se efectúa la eliminación de agua. Si se retira H de una molécula y OH de otra, los dos trozos que quedan se unen, de lo que resulta un dímero (disacárido). Si esto se produce varias veces, se creará una molécula de polímero. Este proceso por condensación tiene igualmente lugar con los lípidos o materias grasas (fig. 6C). Estas tres sustancias (proteínas, polisacáridos y lípidos) son los principales constituyentes de los organismos vivos. La síntesis de ácidos nucleicos (fig. 6D) requiere tres de estas fases de deshidratación. Continuando el proceso, se llega a productos compuestos de millones de unidades.

Pero ¿cómo crear un ácido nucleico, por ejemplo, de manera abiogénica, es decir sin intervención de un organismo vivo? Las reacciones evocadas en la creación de los polímeros implican la eliminación del agua a partir de dos moléculas que proporcionan OH una y H la otra, dejando así dos "extremidades" libres a la búsqueda de otras moléculas con las que combinarse, y el proceso puede repetirse indefinidamente. Pero la reacción debe realizarse en un medio acuoso y, químicamente, es muy difícil de realizar. En efecto, de ordinario, cuando no existe interferencia, la proteína o el hidrato de carbono disuelto en el agua se disgregarán y la reacción se producirá en el sentido inverso. Sin embargo, sabemos que esto es posible porque nosotros estamos compuestos en gran parte por agua, al igual que todos los organismos vivos. Para eliminar el agua, hay que encontrar energía en el interior del sistema. Entonces es cuando entra en juego un rasgo sorprendente de la construcción molecular: la notable capacidad de almacenamiento de energía bajo la forma de enlaces moleculares. Algunas

moléculas poseen un enlace doble entre dos átomos y puede haber otras con un enlace triple. Los enlaces múltiples encierran en sí una reserva de energía, que sirve para capturar agua fuera de las moléculas. La energía almacenada, por ejemplo, en el cianoacetileno (molécula descubierta en el espacio interestelar), toma su origen de la luz que viene de las estrellas. Esta energía se mantiene en reserva y persiste hasta que la molécula (cianoacetileno en el caso citado) se ponga en contacto con compuestos sobre los que pueda reaccionar (aminoácidos, por ejemplo). A partir de estos intermediarios, se llegará a los polipéptidos, después a los biopolímeros. Los detalles de este mecanismo no se discutirán aquí. Nos limitaremos a decir que este tipo de experimentos ya ha sido efectuado en el laboratorio. Hemos podido situar las materias monoméricas en un medio acuoso, añadir algunos compuestos que contienen enlaces múltiples, eliminar el agua entre dos aminoácidos y crear, por ejemplo, péptidos, tripéptidos, etc.

Así las únicas materias encontradas en el espacio interestelar (agua, cianoacetileno, amoníaco), disueltas en agua, a una temperatura conveniente, pueden reaccionar creando productos poliméricos, y esto de manera no biológica: las condiciones esenciales para este fenómeno son inmutables y resultan de la estructura electrónica de los átomos que componen las moléculas.

Acabamos de atravesar la segunda etapa, la que lleva consigo la transformación de los biomonómeros en biopolímeros (fig. 7A). Como la primera etapa que pasa de las moléculas biogénicas —las moléculas primitivas— a los biomonómeros, la segunda etapa que conduce a los biopolímeros ha podido verificarse experimentalmente. Aún estamos lejos de lo "vivo", pero al menos estamos en presencia de los materiales que lo constituyen.

La doble hélice: una configuración más estable

Después de haber fabricado largos polipéptidos (con 200 a 300 aminoácidos por ejemplo), se puede observar cómo se ordenan los elementos en la molécula misma. Esta cadena primaria no es una cuerda floja. Si un compuesto tal es colocado en agua y conservado a la temperatura adecuada (16°C), aparece una segunda estructura generalmente helicoidal, consecuencia de la fijación del enlace carbono-oxígeno sobre el enlace nitrógeno-hidrógeno, separados por tres o cuatro grupos.

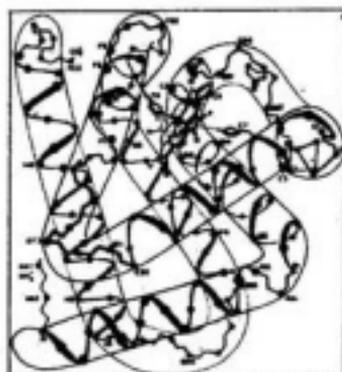
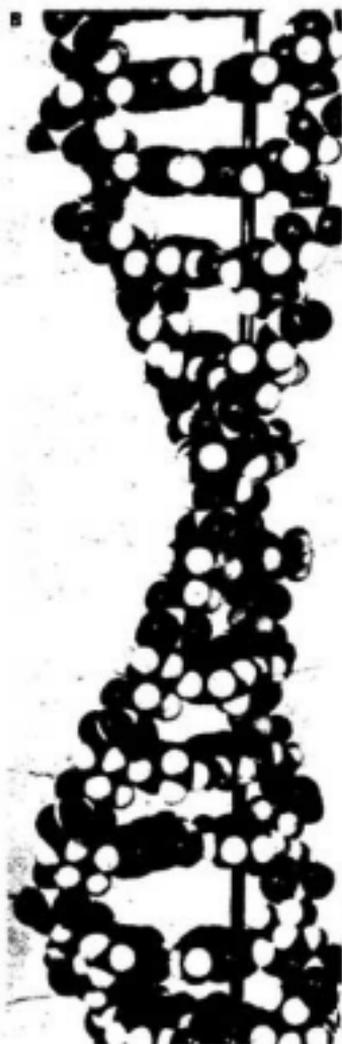
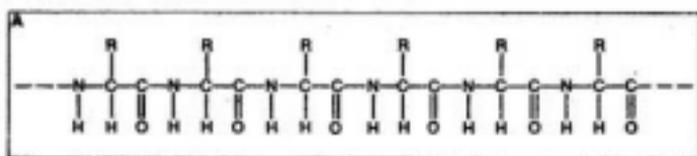


Figura 7. El estudio de la materia viva muestra todas las fases de una organización cada vez más compleja.

A. La determinación de la secuencia de los aminoácidos que constituyen una proteína permite conocer su estructura primaria.

B. Pero esta cadena primaria no suele ser lineal. La combinación de los átomos de su estructura electrónica provoca la aparición de una estructura secundaria, fase esencial en la organización de estructuras vitales. Las proteínas dibujan generalmente una hélice. Sucede lo mismo con los tres elementos que forman los ácidos nucleicos, bases heterocíclicas (C, G, T y A), azúcares y ácido fosfórico. El ADN está formado por una doble hélice que corresponde a la configuración más estable. Desarrollada bajo la acción del calor, vuelve a formarse al enfriarse.

C. La estructura terciaria de las proteínas depende, como su estructura secundaria, de la secuencia de los aminoácidos. En el caso de la mioglobina, representada aquí, el repliegue de las partes derechas y helicoidales de las cadenas peptídicas confiere a toda la molécula un aspecto helicoidal.

D. Se puede también definir una estructura cuaternaria que resultaría de la aglomeración de un conjunto de moléculas. Así, el virus del mosaico del tabaco está compuesto por una hélice nucleica rodeada de pequeñas moléculas proteicas. El conjunto constituye los bastones que se pueden ver aquí.

Las mismas condiciones estructurales existen en los ácidos nucleicos, sustancias mucho más complejas donde es almacenada la información genética. Los tres elementos que constituyen estos ácidos, la base heterocíclica, el azúcar y el ácido fosfórico, dibujan una hélice donde las bases heterocíclicas se superponen unas sobre otras, como un montón de cartas; la cadena azúcar-fosfato determina la estructura helicoidal. Se trata del modelo de la doble hélice del ADN (fig. 7B), y su arquitectura es tal que, cuando se la desarrolla, vuelve a tomar la forma de doble hélice, que corresponde a una configuración más estable. Si se calienta ADN por encima de 60° ó 70°C , la hélice desaparece; al enfriarse recupera su estructura original. Esta nueva etapa, que constituye la aparición de una estructura secundaria en los polímeros depende, como las precedentes, de la colocación de los átomos y de su estructura electrónica. Naturalmente el ADN no es todavía algo vivo; es, pues, necesario buscar cómo continúa la evolución química.

La asimetría molecular y las propiedades autocatalíticas son el patrimonio de la materia viva

Una vez constituidos los polímeros, cierta selección ha sido indispensable, y se hacen patentes dos rasgos principales.

En primer lugar se constata que todos los cuerpos vivos en el momento actual son asimétricos. Esto significa que no se pueden superponer a su imagen en un espejo, lo mismo que una mano derecha no puede superponerse a una mano izquierda. La materia viva está constituida por moléculas asimétricas, que pertenecen generalmente a una de las dos formas posibles. Los aminoácidos, por ejemplo, son casi todos "manos izquierdas", y los azúcares son todos de una misma serie para un compuesto dado.

Esta noción de asimetría está hoy tan fuertemente unida al fenómeno de la vida que sobre ella se basa uno a menudo para decidir el origen vivo o abiótico de los compuestos orgánicos (principalmente de los aminoácidos) descubiertos en los meteoritos.

Otro carácter es propio de los seres vivos: todos son autocatalíticos, es decir, que se fabrican ellos mismos. Ha de tenerse en cuenta esta segunda noción si se quiere comprender bien la selección biológica. Tomemos un compuesto A que tiene dos posibilidades de evolución: hacia B o hacia C. Si C es un compuesto que facilita el paso de A a C, es evidente que A no irá a B, sino a C. Y esto porque desde el momento en que se forme un poco de C, catalizará o inducirá la transformación de A a C. C es autocatalítico, y todo se convertirá en C. En biología no se encuentra nunca más que un tipo de isómero porque las sustancias son autocatalíticas. Esto se debe a una geometría muy específica, y los seres vivos utilizan esta característica para su desarrollo.

En una autocatálisis estereoespecífica (especificidad geométrica), se puede observar este proceso de selección que disminuye el papel del azar. A partir del momento en el que el fenómeno de autocatálisis favorece la selección, el azar ya no interviene.

Por esto es por lo que la autocatálisis constituye la nueva etapa del proceso de evolución química. Se puede tratar ya sea de una sola reacción, ya sea de una comunidad de reacciones en las que el (o los) producto (s) de la operación siguiente cataliza el arranque de toda la secuencia que conduce a ella misma. Esto es lo que llamamos catálisis reflexiva. Estos sistemas aparecen, pues, idénticos, llevan en sí una o varias reacciones. Evidentemente, las sustancias implicadas en tales sistemas autocatalíticos

harán rápidamente la selección para ellas mismas a costa de los que no forman parte del sistema.

Citemos un ejemplo sencillo, no particularmente biológico, pero fácil de observar: el sistema autocatalítico constituido por el acetato cúprico disuelto en piridina o en quinoleína, en presencia de hidrógeno molecular. Termodinámicamente, este sistema es inestable, pero no se moverá durante un período de tiempo indefinido e imprevisible. Si por azar una pequeña cantidad de Cu^{2+} es transformada en Cu^+ , el sistema se pone en marcha porque el Cu^+ cataliza la hidrogenación del Cu^{2+} en Cu^+ . Desde que se desencadena el proceso, el sistema entero convierte el Cu^{2+} en Cu^+ , eventualmente incluso en cobre metálico.

He ahí un caso de autocatálisis selectiva válido en un sistema particular. Si se ejerce sobre bases más sutiles y más amplias, conducirá a la selección de sistemas autocatalíticos capaces de reproducirse ellos mismos. Lo que incluirá no sólo las proteínas catalíticas, sino también los polinucleótidos, portadores de información. Los sistemas catalíticos primitivos son iones metálicos en cantidades vestigiales, como el hierro y el manganeso, y pequeñas moléculas bipolares.

Correctamente asociadas, dan origen a sistemas catalíticos mejorados que facilitan su propia formación.

De la molécula a las estructuras moleculares

La estructura terciaria de las proteínas constituye aún una nueva fase de estudio de las características de la materia. Es engendrada por la estructura secundaria misma. La localización de los bucles presentes en la estructura de la mioglobina, por ejemplo, se debe a ciertas secuencias (fig. 7C).

Yendo siempre más lejos en el estudio de la organización de la materia viva, nos es ahora posible imaginar una estructura cuaternaria, resultado de la aglomeración de un conjunto de moléculas (fig. 7D). Tomemos como ejemplo el virus del mosaico del tabaco (VMT), que es relativamente sencillo. Está constituido por una gran hélice de ácido nucleico y por alrededor de 2.000 moléculas proteicas de escasas dimensiones dispuestas a su alrededor, formando una especie de tallo. Se puede disociar químicamente la partícula de virus, o sus compuestos: proteínas o ácidos nucleicos. Si en una solución, en la que se ha ajustado el pH y la concentración salina, se ponen las moléculas proteicas absolutamente solas,

se agruparán en bastoncillos, los cuales no serán todos de la misma longitud, pues carecen de la materia genética (ácido nucleico) que les daría una talla definida. La proteína dispone de la información necesaria para multiplicarse, pero no sabe cuándo hay que pararse, de ahí la talla variable de los bastoncillos. Si en una segunda etapa se disgregan las moléculas proteicas y se añaden ácidos nucleicos a la solución, el todo se reúne de nuevo, pero esta vez las partículas de VMT son de talla uniforme. Esta experiencia prueba que los virus disociados pueden reunirse de nuevo. Este proceso se inscribe en las estructuras mismas de los ácidos nucleicos y de las proteínas. Es un ejemplo excelente de autoensamblaje. Pero hay mucho camino desde los virus a la célula viva que conocemos. Las partículas virales no son realmente "vivientes", incluso si llevan en sí todos los elementos necesarios para la replicación. No obstante, no se trata de la misma vida de una célula eucariótica, que comprende un núcleo bien definido y una membrana que actúa como barrera entre el medio interior y el mundo exterior. La forma en que las membranas han aparecido y se han diferenciado es un dominio aún desconocido. Los lípidos juegan un gran papel en su formación. En efecto, los experimentos de laboratorio han demostrado que los cuerpos grasos, por el hecho de su estructura y porque poseen una parte hidrófoba (que repele el agua) y una parte hidrófila (que se siente atraída por el agua), formaban una película en la superficie del agua. Cuando se agita una solución acuosa de este tipo conteniendo proteínas en solución, se forman vesículas parecidas a una membrana.

Así, hemos podido seguir el camino que va del hidrógeno primitivo a la atmósfera terrestre para la formación de una estructura celular capaz de reproducirse. Algunas etapas se han podido reproducir en el laboratorio. Los datos modernos de astronomía, de la química y de la biología han permitido imaginar mejor lo que realmente ocurrió durante el período de la "evolución química", limitando así el número de explicaciones posibles y constituyendo un cuadro para elaborar nuevas ideas. ¿Pero se podrá un día dar el salto entre la síntesis de una estructura molecular compleja y la fabricación de un sistema autocatalítico capaz de reproducirse y evolucionar? (en resumen, un sistema que presente todas las características de la vida). Algunos piensan haberlo hecho ya.

10. LA TERMODINAMICA DE LA VIDA

Ilya Prigogine

Toda discusión sobre la posición de la biología con relación a las ciencias físicas conduce antes o después al problema de la situación de los sistemas vivos con relación a las grandes leyes de organización de la física, muy especialmente a la relación entre el origen y el mantenimiento del orden biológico en la termodinámica, lo que después de numerosos años sigue siendo tema constante de discusión. Desde Bergson a Monod, un elevado número de autores han abordado este problema. Ya sea para afirmar como Bergson y Polanyi la originalidad relativa de la vida, ya sea para afirmar que en ello no hay más que un pseudo-problema y que la unidad de las leyes de la naturaleza apenas si plantea duda alguna.

Veremos que actualmente se puede situar mejor el orden biológico y precisar de antemano su dependencia frente a las leyes de la física. La noción de orden, de estructura, tal como nos aparece hoy y que es una de las características esenciales de los sistemas biológicos, está lejos de ser tan sencilla y tan "monolítica" como se pensaba. También, antes de discutir el lazo entre biología y física, estaría bien presentar una breve apreciación de las grandes leyes de organización y de evolución de la física tal como se nos muestran hoy. Entre estas leyes, las de la termodinámica y muy especialmente el segundo principio, continúan jugando un papel central.

1. El segundo principio de la termodinámica, o principio del orden de Boltzmann

El primer principio de la termodinámica afirma la conservación de la energía para todos los sistemas. El crecimiento de la energía en el seno del sistema es igual a la energía recibida por éste. El segundo principio indica que un sistema aislado evoluciona espontáneamente hacia un estado de equilibrio que corresponde a la entropía máxima, es decir, desorden. Estos

dos principios están en la base de la termodinámica clásica y permiten describir la mayor parte de los sistemas en física.

Consideremos un sistema macroscópico, es decir, un sistema que implica un número N de partículas, muy grande, o de otros tipos de subunidades. Suponemos que estas partículas están comprendidas en una porción del espacio separado del mundo exterior por una superficie geométrica ficticia, de tal manera que la densidad numérica, es decir, la relación $N/\text{volumen}$, sea finita. Algunos ejemplos servirán para ilustrar esta noción fundamental. Un centímetro cúbico de un gas a temperatura y presión ordinarias constituye un sistema macroscópico que implica unas 10^{20} unidades en interacción débil, que son las moléculas del gas. El cromosoma de una bacteria, con tal vez unas 10^6 moléculas, puede igualmente ser considerado como un sistema macroscópico. Finalmente, a una escala totalmente diferente, una célula viva que implica 10^4 macromoléculas puede ser considerada, por algunas propiedades globales, como un sistema que obedece a las leyes de la mecánica de los medios continuos. Para todos estos sistemas, la termodinámica prevé leyes de una validez en extremo general que enunciaremos después de haber dado algunas definiciones.

En general, un sistema macroscópico está acoplado a su medio ambiente, que llamamos a menudo "mundo exterior", ya sea por fuerzas que actúan en cada punto en el interior del sistema (por ejemplo, fuerzas de gravitación o fuerzas provenientes de un campo electrónico), ya sea por fuerzas de superficie (por ejemplo, la fricción). Se define un sistema *aislado* como aquel cuyas interacciones con el medio ambiente son tales que no hay intercambio de materia o de energía con el mundo exterior. Un sistema *cerrado* será un sistema que no puede intercambiar más que energía con el mundo exterior. Por último, un sistema *abierto* es un sistema que puede intercambiar energía y materia con el mundo exterior. Así la Tierra en su conjunto es un sistema cerrado que recibe energía de los rayos solares (sin tener en cuenta los intercambios de masa que provienen de las caídas de meteoritos, etc.). Por el contrario, una bacteria *Escherichia coli*, en un medio que contenga glucosa, constituye un sistema abierto.

El primer principio de la termodinámica afirma la conservación de la energía para todos los sistemas. El crecimiento de la energía en el seno del sistema es igual a la energía recibida por éste.

El desorden molecular

El segundo principio introduce una nueva función del estado del sistema, la entropía, relacionada con los intercambios caloríficos con el mundo exterior. Pero contrariamente a la energía, la entropía no se conserva. Por tanto, el incremento de entropía se escribirá como una suma de dos términos unidos: uno, $d_e S$, al aporte exterior de entropía y otro, $d_i S$, a la *producción de entropía* en el seno mismo del sistema: $dS = d_e S + d_i S$. El enunciado del segundo principio se resume entonces en la desigualdad $d_i S \geq 0$, lo cual significa que los fenómenos irreversibles que se desarrollan en el seno mismo del sistema (conducción de calor a través de un sólido, derrame viscoso, etc.) no pueden, pues, más que crear la entropía. Para un sistema aislado el flujo de entropía $d_e S$ es nulo, lo que nos lleva al enunciado clásico $dS \geq 0$. El signo de igualdad se alcanza en un estado particular, el estado de equilibrio al que llega el sistema al cabo de un largo tiempo.

El segundo principio implica, pues, que para un sistema *aislado* existe una función del estado instantáneo del sistema, la entropía S , que no puede más que crecer en el transcurso del tiempo. Esta ley proporciona, pues, un *principio universal de evolución macroscópica*. Pero ¿cuál es su sentido microscópico? ¿Qué significa el aumento de entropía en la escala de las moléculas? Esta cuestión ha sido ampliamente dilucidada por las investigaciones clásicas de Boltzmann: *la entropía es una medida del "desorden molecular"*. La ley de crecimiento de la entropía es, pues, una ley de *desorganización progresiva*, de olvido de las condiciones iniciales particulares. Tomemos un ejemplo sencillo: consideremos un recipiente formado por dos partes idénticas en comunicación una con otra. Un razonamiento elemental muestra que el número P de formas en que podemos repartir N moléculas en dos grupos N_1, N_2 viene dado por $P = N! / N_1! N_2!$. Cualesquiera que sean los números N_1, N_2 de los que partimos en el momento inicial, cabe esperar que para un valor de N grande y al cabo de un tiempo suficientemente largo alcancemos, con pequeñas fluctuaciones, una situación de equilibrio correspondiente a la equiparación de las moléculas entre los dos compartimientos ($N_1 \simeq N_2 \simeq N/2$). La figura 1 da un ejemplo de una distribución realizada con la ayuda de una calculadora electrónica.

Es fácil verificar que la equiparación corresponde al valor máximo de P . En el transcurso de esta evolución, P aumenta. Desde entonces, S y P aumentan a la vez en el transcurso del tiempo. Boltzmann tuvo la genial

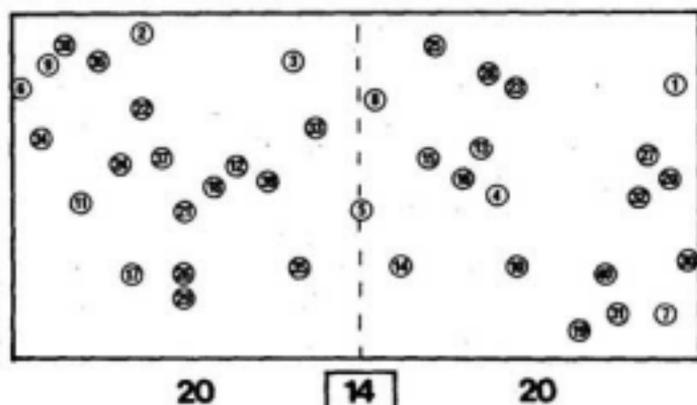
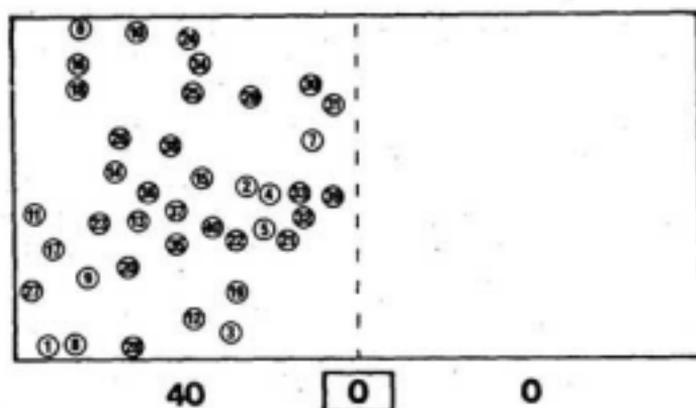


Figura 1. Estas figuras, obtenidas mediante ordenador, muestran la evolución hacia una distribución uniforme de un sistema de 40 partículas en interacción débil en un recipiente. Las partículas están inicialmente en la mitad izquierda del recipiente (esquema 0) y tienen velocidades aleatorias. Después de un cierto tiempo, ocupan las posiciones indicadas en el esquema 14.

intuición de identificar estos dos tamaños. Más exactamente, Boltzmann ha unido la entropía a P mediante la fórmula célebre $S = k \log P$, donde k es la constante universal de Boltzmann. Esta fórmula muestra que el crecimiento de la entropía expresa el crecimiento del desorden molecular medido en términos del número de complejones P . Esta evolución borra

el efecto de condiciones iniciales de las que la simetría fuese "inferior" a la del sistema. Por término medio, para los tiempos suficientemente largos, los dos compartimientos de la figura 1 juegan exactamente el mismo papel. El sistema evoluciona espontáneamente hacia el estado de entropía máxima.

Hemos considerado un ejemplo correspondiente a un sistema aislado. Si abordamos ahora un sistema cerrado a temperatura dada T (sistema inmerso en un termostato), la situación queda análoga, pero debemos considerar, en lugar de la entropía, la energía libre F , definida por $F = E - TS$, donde E y S son respectivamente la energía y la entropía del sistema. En equilibrio, la energía libre F es mínima. La estructura misma de esta fórmula expresa una competición entre la energía E y la entropía S . A baja temperatura, podremos despreocupar el segundo término, y se alcanzarán las estructuras de energía mínima y de entropía débil (porque la entropía está en función creciente de la temperatura). A temperatura más elevada, pasamos, por el contrario, a estructuras de entropía cada vez más elevada. Todo esto está de acuerdo con lo que nos indica la experiencia: a baja temperatura corresponde el estado sólido, de baja entropía, que indica estructura ordenada, mientras que a temperatura suficientemente elevada alcanzamos el estado gaseoso, de entropía más elevada. Vemos, pues, que la formación de ciertos tipos de estructuras ordenadas en física es una consecuencia de las leyes de la termodinámica aplicadas a un sistema no aislado en estado de equilibrio.

Para saber cuál es el estado de equilibrio de un sistema no aislado se puede abordar igualmente el problema de modo diferente y, en lugar de considerar las funciones de estado F y S , preguntarse cuál es la probabilidad para el sistema de encontrarse en el estado de energía E_n en equilibrio. También ha sido Boltzmann quien ha resuelto el problema demostrando que esta probabilidad viene dada por $P = \exp [-E_n/kT]$. A baja temperatura, sólo los niveles "bajos" (con E_n pequeño) serán poblados, mientras que a temperatura suficientemente alta las poblaciones tienden a igualarse a todos los niveles. *Es el principio de orden fundamental de los estados de equilibrio, que podemos llamar el principio de orden de Boltzmann. Es él quien determina si los líquidos son miscibles, si las moléculas elegirán el estado sólido, el líquido o el gaseoso. También es él quien rige las leyes que determinan los cambios de fase en todos sus detalles.*

LAS ESTRUCTURAS ASTRONOMICAS COMO EJEMPLOS DE ESTRUCTURAS NO TERMODINAMICAS

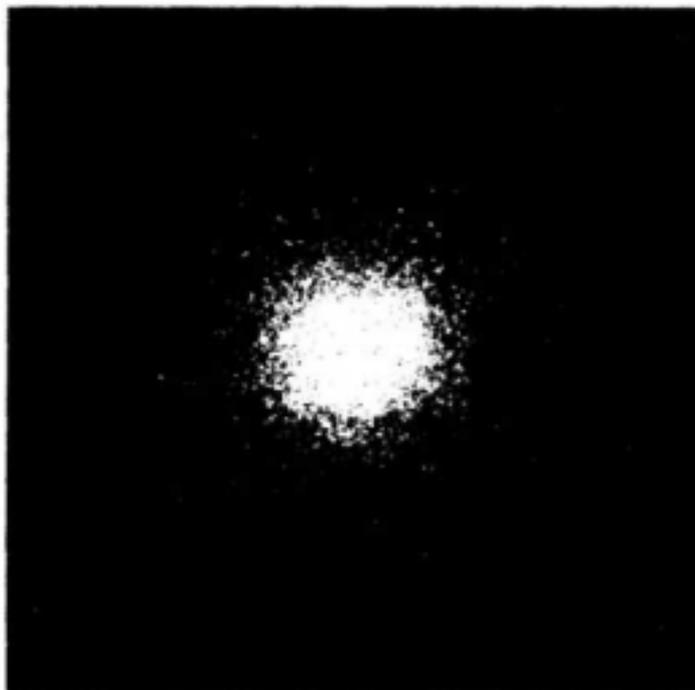


Figura 2. *Las estructuras astronómicas como ejemplo de estructuras no termodinámicas.*

La figura 1 nos ha mostrado un sistema de partículas en interacción débil, descrito por las leyes de la termodinámica clásica. Abandonado a él mismo, tal sistema evoluciona espontáneamente hacia una distribución uniforme. Esta foto que representa un cúmulo estelar esférico muestra que no ocurre lo mismo con un sistema de estrellas. Estas estrellas deben en efecto ser consideradas como "partículas" que actúan entre sí por fuerzas de gravitación de largo alcance para las que no cabe una descripción termodinámica. Numerosas experiencias de la calculadora electrónica muestran que no se presenta ninguna tendencia hacia la homogeneidad. (Cliché Hale Observatory).

Preguntémosnos si el segundo principio de la termodinámica es siempre válido para todos los tipos de fuerzas entre partículas. ¿Es una identidad basada sólo en el gran número de partículas presentes en los sistemas macroscópicos, o son necesarias condiciones más restrictivas?

No hay que olvidar que los experimentos de laboratorio sobre los que se basa el

segundo principio se hacen con moléculas que presentan las interacciones a corto plazo (fuerza de Van der Waals-London; incluso si se trata de iones, las fuerzas efectivas son a corto plazo a causa del fenómeno de pantalla). Pero si se tratase de estrellas, de "partículas" que actuaban entre sí por fuerzas gravitatorias de Newton de largo alcance, ¿cabría hablar aún de termodinámica y de principio de orden de Boltzmann? Muy recientemente numerosos experimentos con la calculadora electrónica han sido efectuados sobre sistemas formados por grandes números de tales partículas¹. Ninguna tendencia hacia la homogeneidad como la descrita anteriormente (ver fig. 1) se presenta. No se puede describir la evolución por un número de complejones crecientes, y desde ese momento parece excluida² una descripción termodinámica.

Investigaciones teóricas recientes han evidenciado también las dificultades de una extensión de la termodinámica a los sistemas gravitatorios (Prigogine y Severne³, Thirring⁴). Las consideraciones usuales que permiten encontrar en la mecánica estática la justificación de la termodinámica no son ya válidas. ¿Existe una termodinámica nueva generalizada en este caso? La pregunta queda abierta.

Es incluso posible que el universo en su conjunto no pueda ser descrito por un gas cósmico uniforme (de Vaucouleurs⁵) y que esta no-uniformidad, que se manifiesta, además, por la formación de *estrellas jerárquicas* cada vez más complejas, esté unida a la imposibilidad de aplicar una descripción termodinámica (Haggerty⁶). De cualquier forma parece probable que al lado de las estructuras termodinámicas regidas por el principio de Boltzmann, existan estructuras *no termodinámicas*, de las que las estructuras astronómicas nos darían un primer y muy interesante ejemplo. La termodinámica aparecería entonces como una aproximación válida para las fuerzas a corto plazo y aplicable para un estado gravitatorio dado en una porción del universo.

1. R.H. Miller, K.H. Prendergast, *Astrophys. J.*, 151, 699, 1968.
2. R.H. Miller, K.H. Prendergast y W.J. Quirk, *Report Coo.*, 614-72, The University of Chicago.
3. I. Prigogine y G. Severne, *Physica*, 32, 1376, 1966.
4. W.E. Thirring, *Ann. Phys.*, 16, 96, 1961.
5. G. de Vaucouleurs, *Science*, 167, 1203, 1970.
6. M. Haggerty, *Physica*, 50, 391, 1970.

2. El orden biológico y la termodinámica

¿Las estructuras biológicas, muy ordenadas, pueden ser descritas como estados de equilibrio regidos por el segundo principio de la termodinámica? Antes de contestar a esta pregunta, conviene destacar los caracteres importantes de los sistemas vivos, que presentan a la vez un orden arquitectónico (estructuras macromoleculares) y un orden funcional (metabolismo) en extremo sofisticados.

¿Podemos interpretar todas las estructuras que nos rodean, y en particular las estructuras biológicas, en términos del principio de orden de

Boltzmann? Ahí está el punto central que debemos discutir. Algunas definiciones y observaciones de tipo general ayudarán a situar mejor el problema. En particular, la caracterización sin ambigüedades del *orden biológico* es delicada. Aquí asociaremos a este término una definición intuitiva basada en los caracteres comunes que sorprenden cuando se estudian los sistemas vivos:

• Incluso en las células más sencillas, el desarrollo normal del metabolismo implica varios miles de reacciones químicas acopladas. De ello resulta una necesidad absoluta de coordinar todos estos procesos. Los mecanismos de coordinación constituyen un *orden funcional* en extremo sofisticado.

• Además, las reacciones metabólicas necesitan catalizadores específicos, las enzimas, que son macromoléculas dotadas de una organización espacial muy compleja. El organismo debe, pues, sintetizar estas sustancias, estas estructuras.

Así el orden biológico será para nosotros un orden estructural y un orden funcional. Añadamos a esto que al nivel celular o supracelular, este orden se manifiesta por una serie de estructuras y funciones acopladas de complejidad creciente. Este carácter *jerárquico* es una de las propiedades más características del orden biológico. Vamos, pues, a interesarnos en las cuestiones siguientes: ¿cuáles son los factores responsables de la aparición y del mantenimiento de este orden biológico? ¿Las estructuras biológicas están regidas por el principio de orden de Boltzmann? Para responder a estas preguntas, un primer punto a considerar es la naturaleza de las fuerzas en el seno de la célula. Hemos visto en efecto que las leyes de la termodinámica estaban establecidas para los sistemas de partículas en interacción débil, y estas leyes no parecen convenir a sistemas de unidades que reaccionan entre sí por fuerzas de largo alcance, como las fuerzas de gravitación, por ejemplo. Así las estructuras astronómicas no pueden ser descritas mediante estas leyes (ver fig. 2).

Ahora bien, lo que conocemos de la constitución física y química de los seres vivos parece indicar que las interacciones en el seno de la célula (o entre varias células en los organismos más desarrollados) son interacciones usuales de corto alcance, análogas, pues, a las interacciones débiles que hay entre las partículas de los sistemas en equilibrio termodinámico que se estudian en física. La naturaleza de las fuerzas en el seno de la célula no es incompatible con las leyes de la termodinámica clásica que hemos definido. ¿Estas últimas permiten, sin embargo, dar cuenta de las estructuras biológicas? Es lo que vamos a ver en la parte siguiente del artículo.

3. Las estructuras disipativas: orden de fluctuaciones

Para abordar el tema central de esta exposición, el problema del orden biológico, es necesario introducir una noción nueva: la de la estructura "disipativa", de la cual la *inestabilidad de Bénard* en hidrodinámica proporciona un buen ejemplo.

Vamos, pues, ahora a abordar el tema central de esta exposición, el problema del orden biológico.

Resulta notable que, en la misma época en la que se formuló la termodinámica, también se introdujeron las teorías de la evolución biológica y sociológica. Pero contrariamente a la idea termodinámica de evolución, la idea de evolución en biología y en sociología está asociada a un crecimiento de la organización, a la formación de estructuras y de funciones cada vez más complejas. Spencer llegó a hablar hasta de la "inestabilidad de lo homogéneo" y de una fuerza diferenciadora creadora de organización. Ahora bien, la multiplicación de estructuras muy ordenadas parece incompatible con el segundo principio de la termodinámica; aquél implica en efecto, como hemos visto, que todo sistema macroscópico no puede evolucionar más que con aumento de entropía, es decir, con degradación del orden que lo caracteriza.

Es verdad que los biólogos insisten actualmente sobre el hecho de que el teorema del aumento de entropía se aplica al sistema completo, es decir, al sistema vivo, más su medio ambiente. En otras palabras, un sistema vivo no puede ser asimilado a un sistema aislado, para el que la desigualdad $dS \geq 0$ es válida, sino más bien a un *sistema abierto*, es decir, a un sistema que intercambie energía y materia con el mundo exterior. De tal modo, el aumento de entropía del sistema completo es perfectamente compatible con la disminución de entropía en el seno del sistema vivo que debió darse durante la formación de las estructuras organizadas. Pero este enfoque no nos dice nada sobre los mecanismos que conducen a una organización molecular. No basta con saber que la evolución de los sistemas vivos puede corresponder a un aumento de entropía del universo (en tanto que se pueda considerar éste como un sistema cerrado) y estar de acuerdo con el segundo principio de la termodinámica. Debemos buscar si existe una descripción termodinámica de los procesos evolutivos del sistema vivo mismo, estando relacionados estos procesos con estados ajenos al equilibrio termodinámico.

Conviene primero analizar con detalle la noción de estado termodinámico de no-equilibrio. En un sistema aislado, lo hemos visto, el segundo

ORDEN FUNCIONAL Y ORDEN ESTRUCTURAL

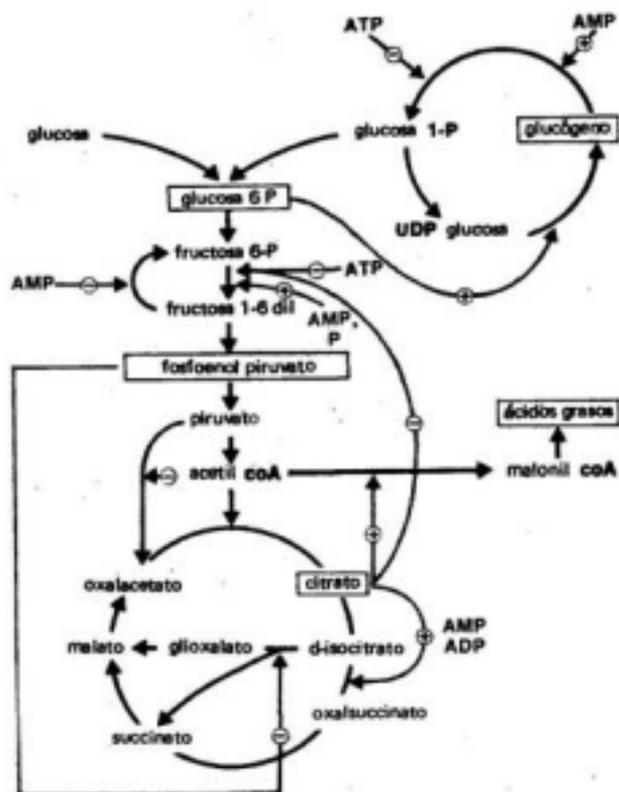
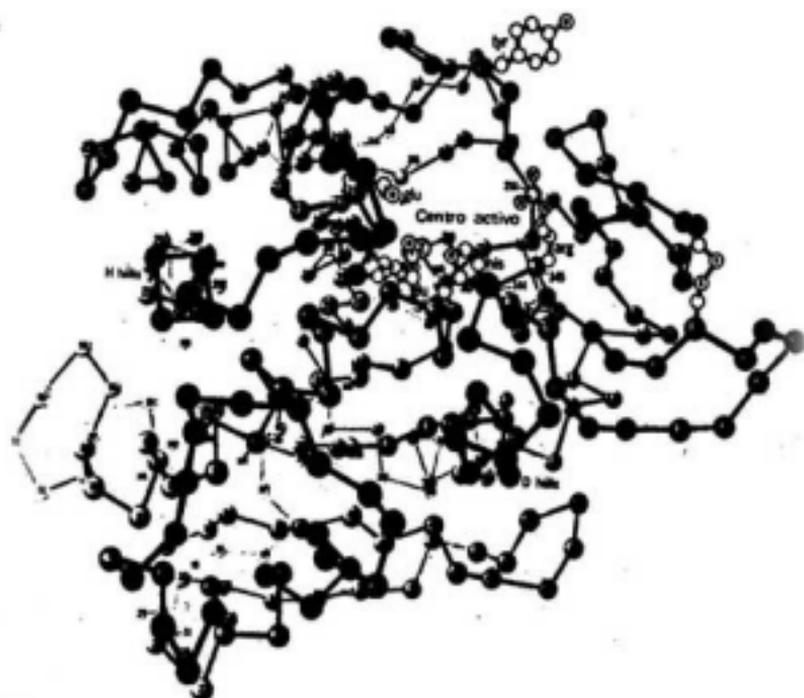


Figura 3. El orden biológico descubre de hecho dos tipos de órdenes en extremo sofisticados: el orden funcional y el orden estructural. En las células, el desarrollo normal del metabolismo necesita una coordinación entre miles de reacciones químicas. Los mecanismos de coordinación constituyen el orden funcional. Las reacciones que intervienen en la glucólisis son un ejemplo de ello. Algunas moléculas sintetizadas activan o inactivan por sistemas de contrarreacción más o menos complejos las enzimas que intervienen en otras reacciones. Estas reacciones necesitan en particular catalizadores específicos, las enzimas, que son macromoléculas dotadas de una organización espacial muy compleja. Este orden estructural, determinado por



el código genético, permite una especialización muy fina de estas enzimas que inducirán ciertas reacciones concretas. Aquí vemos una carboxipeptidasa A que hidroliza el enlace peptídico situado en el extremo carboxílico de una cadena polipeptídica (esquema según R.E. Dickerson y I. Geis, *The structure and action of proteins*, Harper and Row ed.).

principio implica que la entropía crece hasta alcanzar su máximo. El sistema tiende, después de un régimen transitorio más o menos corto, hacia un estado permanente unívoco que es el equilibrio termodinámico.

Consideremos ahora, en lugar de un sistema aislado, un sistema abierto que pueda intercambiar a la vez energía y materia con el medio externo. En este caso, por más que las reservas externas de energía y materia sean suficientemente grandes como para mantenerse invariables, el sistema puede tender a un régimen constante distinto al del equilibrio. Es un estado estacionario de no-equilibrio. Mientras que un sistema aislado en equilibrio está asociado a estructuras "en equilibrio" (un cristal por ejemplo), un sistema abierto "sin o fuera de equilibrio" estará asociado a lo que se llaman "estructuras disipativas", las cuales vamos a describir. El principio de orden de Boltzmann, que da una buena descripción de los estados de equilibrio, no es aplicable en este caso. Las estructuras disipativas están asociadas a un principio de orden totalmente diferente, que se podría llamar "orden por fluctuación".

La inestabilidad de Bénard

Antes de esbozar la teoría termodinámica de las estructuras disipativas veamos un ejemplo particularmente sencillo en el terreno de la hidrodinámica: es la inestabilidad de Bénard⁷.

Calentemos una capa líquida por su parte inferior. Tras la aplicación de esta energía, el sistema se separa del estado de equilibrio correspondiente al mantenimiento de una temperatura uniforme en la capa. Para pequeños gradientes de temperatura, el calor se transporta por conducción, pero a partir de un gradiente crítico tenemos, además, un transporte por convección. La figura 4 nos muestra una foto de las células de convección tomadas verticalmente. Hay que señalar la organización regular de las células, que tienen forma hexagonal.

Tenemos aquí un fenómeno típico de estructuración correspondiente a un nivel elevado de cooperatividad desde el punto de vista molecular. Antes de la inestabilidad de Bénard, la energía del sistema residía totalmente en su energía de agitación térmica. Después, una parte es transferida en corrientes macroscópicas ordenadas comprendiendo un número muy elevado de moléculas. El hecho notable es que las estructuras de este tipo son creadas y mantenidas gracias a los intercambios de energía

7. S. Chandrasekhar, *Hydrodynamic and Hydromagnetic Stability*, Clarendon Press, Oxford, 1961.

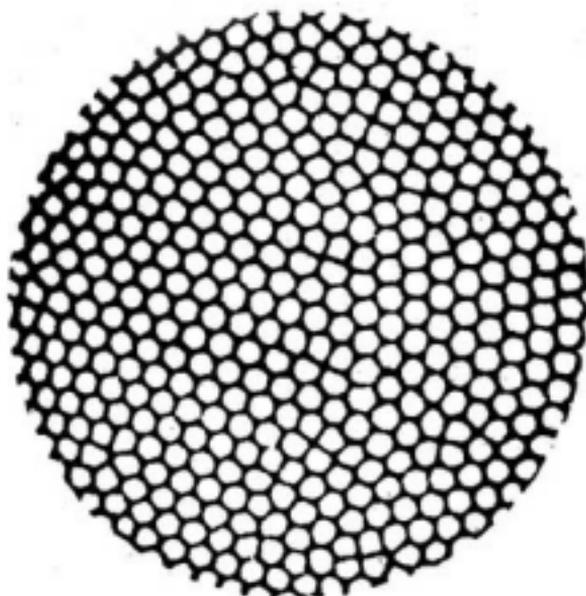


Figura 4. Ejemplo de estructura disipativa en hidrodinámica: la inestabilidad de Bénard. Se calienta una capa líquida por debajo. Después de la aplicación de esta tensión, el sistema se desvía del estado de equilibrio correspondiente al mantenimiento de una temperatura uniforme en la capa. Para los pequeños gradientes de temperatura, el calor es transportado por conducción, pero, a partir de un gradiente crítico, se observa, además, un transporte por convección. La figura muestra las células de convección en el espermaceti fotografiadas verticalmente. Se aprecia el alineamiento regular de las células de forma hexagonal.

con el mundo exterior, en condiciones de no-equilibrio. Por esta razón se llaman *estructuras disipativas*.

Es evidente que el principio de Boltzmann no se aplica apenas aquí. Daría una probabilidad prácticamente nula en la corriente macroscópica. Es sólo porque tenemos una coacción exterior (que es aquí el gradiente de temperatura) y porque el sistema está suficientemente lejos del equilibrio, por lo que puede aparecer una estructura cooperativa nueva.

Se demuestra que esta estructura nace después de una inestabilidad del sistema cerca del equilibrio termodinámico. Podría representarse la situación física de la siguiente manera: pequeñas corrientes de convección aparecen continuamente, como fluctuaciones, pero por debajo del valor crítico del gradiente estas fluctuaciones experimentan una regresión. Por el

contrario, más allá de este punto crítico, algunas fluctuaciones son amplificadas y dan origen a una corriente macroscópica. Aparece un orden nuevo correspondiendo esencialmente a una fluctuación gigante estabilizada por los intercambios de energía con el mundo exterior. Es el *orden por fluctuación*.

4. Termodinámica generalizada

Para explicar el nacimiento de una estructura disipativa, hay que tener en cuenta las fluctuaciones susceptibles de engendrarla en una termodinámica de fenómenos irreversibles. Esto se hace en el cuadro de la "termodinámica generalizada" desarrollada por el autor. Estructuras disipativas espaciales o temporales aparecen cuando el medio externo mantiene un estado de no equilibrio tal que la amplificación de las fluctuaciones se hace posible y conduce a estados macroscópicos más organizados.

El ejemplo de la inestabilidad de Bénard nos muestra que para comprender el nacimiento de una estructura de no-equilibrio, es necesario incorporar las fluctuaciones que podrían dar origen a esta estructura en la termodinámica de fenómenos irreversibles. Más adelante, estudiaremos con detalle la relación entre estructuras disipativas y funciones responsables del mantenimiento del orden biológico. Pero podemos desde ahora señalar que la diferenciación de las estructuras y de las funciones que caracteriza al orden biológico sugiere que el funcionamiento de los seres vivos se efectúa en condiciones de no-equilibrio.

Una termodinámica "generalizada" ha sido desarrollada en el transcurso de estos últimos años por el autor y sus colegas de Bruselas, muy en especial P. Glansdorff. Voy a exponer brevemente las bases de esta teoría siguiendo una aproximación intuitiva basada en la teoría de las fluctuaciones. Hemos visto que la entropía de un sistema aislado es máxima en el equilibrio termodinámico. Pero a causa de la estructura molecular del sistema, hay que extenderse a las fluctuaciones. Un sistema macroscópicamente homogéneo no lo es en la escala molecular. Sus fluctuaciones conducen a una separación en el nivel de la entropía máxima.

Podemos desarrollar la entropía del estado fluctuante alrededor de su valor de equilibrio S_0 . Tendremos, en términos de orden superior aproximados, $S = S_0 + \delta S + 1/2 \delta^2 S$. Como estamos próximos a un

máximo, tendremos $S = 0$ y $\delta^2 S < 0$. Para que el estado referencia S_0 sea estable, es necesario igualmente que la entropía de exceso $\delta^2 S$ crezca con el tiempo: $(d/dt) \delta^2 S > 0$, sin que la fluctuación se amplifique y el sistema se separe de su estado de referencia.

La termodinámica generalizada que hemos desarrollado permite expresar esta condición en términos de fluctuaciones de las velocidades de los fenómenos irreversibles y de fuerzas generalizadas. Se encuentra en efecto $(d/dt) \delta^2 S = \sum \delta J_\rho \delta X_\rho$, en donde J_ρ son las velocidades de los fenómenos irreversibles tales como velocidad de reacción química, de difusión, y los X_ρ las fuerzas correspondientes, llamadas afinidades en el caso de las reacciones químicas.

En las proximidades del equilibrio termodinámico, se demuestra sin dificultad que la desigualdad $(d/dt) \delta^2 S > 0$ se satisface siempre. El sistema es estable; el principio de orden de Boltzmann domina incluso si el sistema es temporalmente perturbado por una fluctuación. Pero lejos del equilibrio termodinámico, no es necesariamente así. En presencia de no linealidades apropiadas, la desigualdad $(d/dt) \delta^2 S > 0$ puede cesar de ser válida y el sistema podrá evolucionar hacia un nuevo régimen, claramente un régimen que dé lugar a estructuras ordenadas.

En el transcurso de los últimos cuatro años hemos estudiado con detalle, en nuestro grupo, el comportamiento de los sistemas abiertos de reacciones químicas y los fenómenos de transporte, y la posibilidad de obtener estados de "no-equilibrio" termodinámico correspondientes a estructuras ordenadas. En esos casos, es la termodinámica *no lineal* (para los estados alejados del equilibrio, ya no hay leyes lineales entre corrientes y fuerzas desarrollándose en el sistema) quien rige los fenómenos observados.

La elección de este tipo de sistema vivo depende en gran parte de ciertos tipos de *reacciones químicas no lineales* (reacciones que comprenden etapas catalizadas por enzimas, control de actividad de éstas por los procesos de activación o de inhibición, etc.) y fenómenos de transporte (paso de iones a través de las membranas, difusión de los ARN de transferencia a las vecindades de ribosomas, etc.). Se ha demostrado, primero sobre modelos químicos que comprendían etapas no lineales, que pueden existir posibilidades de no-equilibrio.

Mientras que en el equilibrio termodinámico y para débiles desviaciones (aproximación lineal) se observa una homogeneidad espacial y temporal, se puede prever para tales sistemas y para mayores desviaciones del equilibrio un umbral de inestabilidad (dependiendo su valor de los



Figuras 5 y 6. Ejemplos de estructuras disipativas en química: caso de la reacción de Zhabotinsky correspondiente a la oxidación del ácido malónico por el bromato de potasio en presencia de iones cerio. Las líneas sombreadas corresponden a un exceso de Ce^{3+} y las regiones claras a un exceso de Ce^{4+} . La figura 5 muestra la evolución del sistema por oscilación hacia una estructura disipativa espacial. La figura 6 muestra la estructura disipativa espacial obtenida al final de cierto tiempo y que se mantiene varias horas. En esta estructura, los iones Ce^{3+} y Ce^{4+} son mezclados alternativamente en capas horizontales. Hecho el experimento en sistema cerrado, éste evoluciona obligatoriamente hacia el equilibrio termodinámico caracterizado por la homogeneidad. En un momento, el sistema evoluciona bruscamente, y todo el fenómeno de estructuración desaparece en algunos segundos.

parámetros cinéticos y de las constantes de difusión), más allá del cual el sistema puede presentar un comportamiento periódico en el tiempo, una ruptura espontánea de la homogeneidad espacial o fenómenos todavía más complejos.

Señalemos que este comportamiento lejos del equilibrio no es universal. La aparición de comportamientos coherentes de este tipo exige condiciones particulares, mientras que, en las proximidades del equilibrio, el principio de Boltzmann es *siempre* válido (para las fuerzas a las que la termodinámica se aplica).

La existencia de estructuras disipativas

La aparición de estructuras disipativas en los sistemas no lineales y a distancia suficiente del equilibrio no sólo se ha establecido mediante experiencias con calculadoras sobre sistemas modelos. Recientemente, han tenido lugar varios experimentos en laboratorios que demuestran la existencia de tales estructuras. Antes de abordar los aspectos biológicos, es interesante presentar un ejemplo procedente de la química no biológica.

Un caso particularmente bien conocido es la reacción de Zhabotinsky⁸ correspondiente a la oxidación del ácido malónico por el bromato de potasio en presencia de iones cerio. Las figuras 5 y 6 muestran algunas etapas evolutivas de este sistema. Las líneas oscuras corresponden a un exceso de Ce^{3+} y las regiones claras a un exceso de Ce^{4+} . Para algunos valores de concentración, se observan primero oscilaciones, después se desprende una estructura espacial que se mantiene durante varias horas.

Como el experimento se hizo en sistema cerrado, éste evoluciona obligatoriamente hacia el equilibrio termodinámico, caracterizado por la homogeneidad. En un momento, el sistema evoluciona bruscamente, y todo el fenómeno de estructuración desaparece en unos segundos. Tenemos, pues, aquí un excelente ejemplo de comportamiento coherente, hecho posible por una desviación suficiente en el equilibrio termodinámico.

8. M. Herschkowitz-Kaufman, *C.R. Acad. Sc.*, 270, 1970; A.M. Zhabotinsky, *Oscillatory Processes in Biological and Chemical Systems* (en ruso), Moscú: 1967.

5. Estructuras disipativas en biología

¿Cuál es el papel de las estructuras disipativas en el funcionamiento actual de los seres vivos y en los estados prebiológicos?

Para el primer punto, se demuestra que las reacciones metabólicas, o las ondas cerebrales, por ejemplo, pueden ser analizadas en términos de estructuras disipativas temporales. En lo que concierne a los estados prebiológicos, los trabajos de Eigen pueden aportar una contribución fundamental. Este ha demostrado en efecto que, para un sistema formado por proteínas y polinucleótidos, las interacciones permitirían al sistema alcanzar un estado final caracterizado por un código genético y una estabilidad considerable.

Se puede ver ahora cómo enlazar el orden biológico a las estructuras disipativas. En efecto, un sistema biológico que metaboliza y que se reproduce debe intercambiar energía y materia con su medio ambiente; funciona, pues, como un sistema abierto. Por otra parte, como he subrayado, el mantenimiento de la vida y el crecimiento dependen de gran número de reacciones químicas y de fenómenos de transporte cuyo control implica elementos altamente no lineales (activación, inhibición, autocatálisis directa, etc.). Por último, el aporte de energía o de materia se hace generalmente en condiciones de no-equilibrio, porque los productos de reacción resultan ya sea rechazados por el sistema vivo, ya enviados a otros emplazamientos de la célula para cumplir otras funciones. En resumen, el funcionamiento de los sistemas biológicos parece cumplir las condiciones necesarias para la aparición de estructuras disipativas. El interés de este punto de vista viene claramente de lo que puede ser comprobado experimentalmente. Es útil distinguir dos tipos de problemas:

- ¿Las estructuras disipativas juegan un papel en el funcionamiento actual de los seres vivos? Esta pregunta concierne al papel de las estructuras disipativas en el mantenimiento de la vida.
- ¿Las estructuras disipativas han participado de manera esencial en los estados prebiológicos? Es el problema del origen de la vida.

En estos dos casos, empezamos a tener algunas indicaciones todavía modestas. Resumamos algunas de ellas.

Metabolismo y estructura disipativa

Algunas reacciones enzimáticas importantes se han estudiado con detalle desde el punto de vista de su cinética, en particular la reacción de la glucólisis. Los datos experimentales que existen actualmente indican que las concentraciones de los constituyentes químicos que participan en estas reacciones presentan oscilaciones mantenidas (ver también el artículo de Th. Vanden Driessche, la *Recherche*, núm. 10, marzo 1971). Por otra parte, se conoce suficientemente el mecanismo reactivo y las propiedades de las enzimas de este sistema para poder elaborar modelos matemáticos que describen la glucólisis. El equilibrio detallado de tales modelos indica que estas oscilaciones pueden ser interpretadas como ciclos limitados estables en el tiempo (oscilaciones de período y amplitud constantes), que surgen más allá de la inestabilidad de un estado estacionario de no-equilibrio. En otras palabras, la glucólisis es una estructura disipativa temporal. Como se trata de reacciones esenciales para la energética de las células vivas, es un resultado importante.

En el momento actual se dispone de otros varios ejemplos de oscilaciones mantenidas, tanto para las reacciones metabólicas como para la síntesis de proteínas a nivel celular. No entramos en detalles, dado que los mecanismos reactivos son mucho peor conocidos que para la glucólisis.

Sistema nervioso y estructuras disipativas

Se han obtenido resultados interesantes sobre dos planos diferentes: el nivel elemental que concierne al fenómeno fundamental de la excitabilidad de membranas y el nivel supracelular que concierne al fenómeno de actividad rítmica.

Una membrana excitable, tal como una membrana de una célula nerviosa, puede existir en dos estados permanentes por lo menos: un estado polarizado (que proviene del mantenimiento de cargas iónicas diferentes por los dos lados) y un estado despolarizado que resulta del primero a continuación de un cambio de permeabilidad. Blumenthal, Changeux y Lefever⁹ han demostrado recientemente que este estado de despolarización, que se presenta como un fenómeno discontinuo en el tiempo, se obtiene a continuación de una inestabilidad del estado

9. R. Blumenthal, J.P. Changeux y R. Lefever, *J. Membrane Biol.*, 2, 351, 1970.

DIFERENCIACION PRIMITIVA ENTRE LAS CELULAS

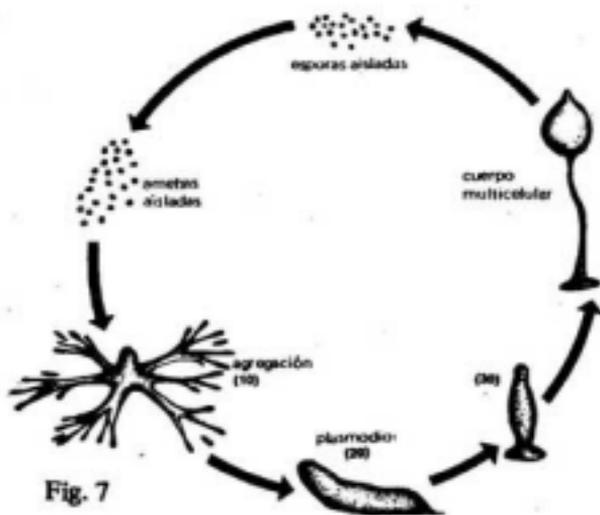


Fig. 8

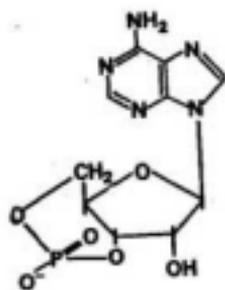
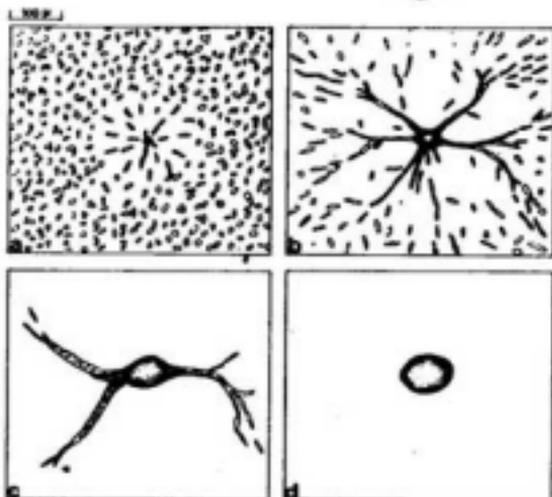


Fig. 9

Figuras 7, 8 y 9. Diferenciación primitiva entre las células

Algunos organismos unicelulares alcanzan, durante su vida, un nivel de organización en el que las células individuales forman colonias en las cuales se observa una diferenciación primitiva. Tal nivel de organización se advierte en una familia de amebas, las acrasiales.

La figura 7 resume según Sussmann (*) el ciclo de vida de la especie *Dictyostelium discoideum*. La fase unicelular de la vida de este organismo procede por mitosis ordinaria de células individuales. Cuando el alimento, que en general consiste en bacterias, se agota, las amebas comienzan a segregarse. Durante esta "condensación", se desplazan radicalmente hacia los centros de atracción que parecen formarse espontáneamente.

Aproximándose al centro, constituyen un conjunto cónico de células que forman finalmente una masa multicelular móvil (pseudoplasmodio) pudiendo contener, según las propiedades genéticas de las células, de ~ 10 a $\sim 10^5$ células. El pseudoplasmodio cambia su forma y al mismo tiempo se diferencia en un cuerpo compuesto por dos estructuras distintas: un pie que lleva en sí cerca de un tercio de la masa total y que es rico en celulosa, y una masa redonda en la parte de arriba que es rica en polisacáridos. Se observan también variaciones regionales de concentración de enzimas. Se trata, pues, de una verdadera diferenciación entre los dos tipos de células. La duración total del proceso es de unas 20 a 50 horas. Los números entre paréntesis son las horas después de que se detiene la división celular. La figura 8 muestra la combinación del *D. discoideum* en una capa líquida: a) formación de un centro de combinación; b) condensación radial de las amebas hacia el centro; c) y d) etapas finales y formación de un pseudoplasmodio. Apreciemos que después de la combinación las células no se dividen más.

¿Cuál es el origen de esta formación espontánea de combinaciones? Uno puede convencerse con bastante facilidad de que la combinación no puede deberse a fuerzas específicas de superficie provocadas por el contacto directo entre células. En efecto, en un cultivo típico de amebas, la distancia media entre células es del orden de 200μ , mientras que el diámetro de una célula individual es sólo de 15μ . Los efectos eléctricos o magnéticos no parecen importantes.

Estos resultados han llevado a Bonner a postular la existencia de una sustancia química que sería segregada por las amebas y que constituiría el origen de la combinación. A la sustancia se le ha dado el nombre de acrasina. Actualmente parece establecido que esta sustancia existe y que se trata en efecto del AMP cíclico (ver fig. 9), que juega también un papel mediador importante en la circulación de las hormonas en los animales superiores.

(*) M. Sussmann, *Growth and Development*, Prentice-Hall, New Jersey, 1964.

polarizado, que es un estado "fuera de equilibrio". En el estado "polarizado", la diferencia de concentración iónica de los dos lados de la membrana juega el papel de contención manteniendo el sistema lejos del equilibrio: puede producirse una inestabilidad, la cual da origen a un estado de despolarización cíclica.

Desde el punto de vista del comportamiento global, se averiguó después de largo tiempo que el sistema nervioso central es base de fenómenos rítmicos mantenidos que tienen frecuencias características reproducibles. Bayarsky¹⁰ hizo un estudio sugestivo de esta actividad rítmica. Más recientemente Cowan y Wilson¹¹ han deducido ecuaciones diferenciales no lineales que describen la dinámica y los acoplamientos entre poblaciones localizadas de neuronas que contienen a la vez células excitadoras e inhibitoras. Demuestran que este sistema puede presentar comportamientos rítmicos cuya frecuencia fundamental dependa del estímulo aplicado. Estas conclusiones, así como el resultado teórico de que un comportamiento periódico en el tiempo aparece necesariamente tras de una inestabilidad de no-equilibrio, implican, pues, que las ondas cerebrales puedan ser analizadas en términos de estructuras disipativas temporales. Citemos por fin el trabajo de Moore¹² que evidencia la influencia de los procesos metabólicos de no-equilibrio sobre la modulación de la actividad de un conjunto de neuronas.

Crecimiento y desarrollo: estructuras disipativas

Uno de los problemas más apasionantes de la biología moderna es el análisis de los mecanismos del desarrollo: la complejidad del fenómeno para un organismo relativamente avanzado parece enorme. ¿Qué mecanismos organizan con tanta precisión el principio y el fin del crecimiento? ¿Cómo coordina el organismo en el espacio y en el tiempo, hasta en sus mínimos detalles, las diferentes etapas de su desarrollo? ¿Cómo comprender la diferenciación en células, tejidos y órganos que tienen formas y funciones concretas, pero distintas (morfogénesis)? El problema consiste, en gran parte, en cómo comprender los mecanismos de comunicación y de

10. L.L. Bayarsky, *Curr. Mod. Biol.*, 1, 39, 1967.

11. H.R. Wilson y J.D. Cowan, "Excitatory and Inhibitory Interactions in Localized Populations of Model Neurons", preprint, Univ. de Chicago, 1971.

12. W.J. Moore, preprint, Univ. de Indiana, 1971.

asociación intercelulares. En efecto, en ausencia de enlaces intercelulares, los organismos superiores se descompondrían en células individuales y no podrían ya distinguirse de las formas de vida unicelular. Por otra parte, en ausencia de especificidad y de selectividad de estos enlaces, no habría tejidos ni órganos especializados, sino sencillamente una masa amorfa de células.

Comprender la manera en que unos millones o miles de millones de células se comunican para dar lugar a una estructura tal, por ejemplo, que el sistema nervioso central de un mamífero parece imposible en el momento actual. Felizmente, sucede que ciertos organismos unicelulares alcanzan, durante su vida, un nivel de organización en el que células individuales forman colonias en las cuales se observa una diferenciación primitiva entre células. Tal nivel de organización se observa en una familia de amebas, las acrasiales. Así, a lo largo de su ciclo vital, estas amebas pueden unirse espontáneamente y formar un cuerpo multicelular (figs.7 y 8).

Este proceso está mediado por una sustancia química, la acrasina, que de hecho es un AMP cíclico y que es segregado por las células.

Recientemente, Keller y Segel¹³ demostraron que la iniciación de esta agregación puede ser interpretada como una inestabilidad de la distribución uniforme (correspondiente, pues, a la ausencia de una agregación) de células individuales. Para establecer este resultado, postulan que la producción de acrasina por las células es un proceso que implica etapas prácticamente irreversibles, es decir, lejos del equilibrio termodinámico. En otros términos, al menos las primeras etapas de la agregación podrían interpretarse como una estructura disipativa espacial.

Resulta tentador extrapolar estas consideraciones y esperar que los fenómenos observados en las acrasiales puedan proporcionar indicaciones concernientes al desarrollo de los organismos superiores. Si fuera así, la interpretación en términos de estructuras disipativas proporcionaría un principio unificador en estos procesos en extremo variados y complejos.

En conclusión, parece, pues, establecido que los procesos biológicos importantes implican inestabilidades que no son posibles más que lejos del estado de equilibrio termodinámico.

Pasemos al problema de las etapas prebióticas. El papel posible de las estructuras disipativas en la síntesis abiótica de los polipéptidos por condensación sobre superficies catalíticas ha sido subrayado por

13. E.F. Keller, y L.A. Segel, *J. Theoret. Biol.*, 26, 399, 1970.

Katchalsky y cols.¹⁴. Pero el problema más fundamental es sin duda el estudiado por Eigen¹⁵ concerniente a la evolución de poblaciones de moléculas de interés biológico y a la formación espontánea de un "código genético" por una sucesión de inestabilidades.

En realidad hay que distinguir por lo menos dos tipos de problemas:

- La formación de polímeros de interés biológico que cubran las funciones que los monómeros no pueden, seguramente, realizar. Un ejemplo muy conocido es la síntesis del polímero que puede desempeñar el papel de "template" para su propia replicación o para la síntesis de otras macromoléculas.

- Suponiendo que las poblaciones de moléculas de interés biológico que puedan replicarse estén ya presentes, ¿cuál será la evolución ulterior de tal sistema?

El primer problema es quizás más sencillo. Se puede demostrar, por lo menos a nivel de modelos (Goldbeter, Nicolis, Babloyantz¹⁶), que la síntesis por replicación, por ejemplo, la de los ácidos nucleicos sobre "template", no se hace dominante con relación al mecanismo ordinario de polimerización lineal más que a partir de una distancia crítica del equilibrio y corresponde desde entonces a una primera inestabilidad. El problema estudiado por Eigen corresponde al segundo punto. La complejidad de este problema es considerable: los fenómenos de replicación que conducen a errores corresponden en resumen a un tipo nuevo de fluctuaciones en el sentido termodinámico. Estas fluctuaciones pueden ser amortiguadas o amplificadas. La evolución corresponde a una serie de "catástrofes" de inestabilidad, es decir, a una amplificación de fluctuaciones hasta la aparición eventual de un estado dominado por ciertos tipos de macromoléculas y provisto de una estabilidad suficiente con relación a las fluctuaciones que engendra el mismo. El trabajo de Eigen demuestra que en un sistema formado únicamente por proteínas (sin polinucleótidos) la sucesión de inestabilidades se prolonga indefinidamente. Por el contrario, las interacciones entre polinucleótidos y proteínas permitirían al sistema alcanzar un estado final caracterizado por un código genético y correspondería a una estabilidad notable con relación a los "errores" de la cinética, sobre todo con los procesos de replicación sobre "template".

14. M. Paecht-Horwitz, J. Berger, A. Katchalsky, *Nature*, 228, 636, 1970.

15. M. Eigen, "Selforganization of matter and the Evolution of Biological Macromolecules", *Naturwissenschaften*, 58, 465, 1971.

16. A. Goldbeter, G. Nicolis, A. Babloyantz, trabajo en curso.

Si la teoría de Eigen se confirma, se trataría entonces de un campo de investigación fundamental, pues por primera vez un estado altamente organizado, correspondiente a un código genético, emergería de manera concreta a partir de leyes físicas.

Es posible que el problema del origen de las funciones más "nobles" de nuestro cerebro, como, por ejemplo, el lenguaje (ver el artículo de Irene Lézine, *la Recherche*, núm. 15, septiembre 1971), pueda ser formulado en la misma línea que la teoría de Eigen. Este resultado constituiría una síntesis desatendida entre el punto de vista estático estructuralista que habitualmente es el de la biología molecular y el punto de vista histórico, que es el de la termodinámica. Principio de orden de Boltzmann, estructuras disipativas y código son los eslabones de una cadena que conduce del equilibrio termodinámico al orden biológico.

El azar y la necesidad cooperan en lugar de oponerse

Resumamos nuestras conclusiones. Lejos de escaparse de las leyes físicas, o de aparecer como obra de algunos demonios de Maxwell luchando contra el segundo principio, la vida aparece como siguiendo las leyes de la física con una plasticidad particular debida a su composición química y a las leyes cinéticas que resultan de ello. No importa que, para situar las estructuras biológicas, parezca esencial apartarse del principio de orden de Boltzmann y tener en cuenta que los fenómenos biológicos característicos se desenvuelven lejos de un estado de equilibrio termodinámico. Habría, pues, un verdadero umbral entre vida y no vida, pero hay que guardarse de ideas demasiado simplistas. No es la inestabilidad sino una sucesión de inestabilidades quienes han permitido franquear el *no man's land* entre vida y no vida. Nosotros sólo empezamos a despejar algunas estapas.

Esta concepción del orden biológico conduce automáticamente a una apreciación más matizada de lo que puede ser el papel del azar y de la necesidad, por volver a tomar el título de la conocida obra de Jacques Monod. La fluctuación que permite al sistema dejar los estados próximos del equilibrio termodinámico representa el elemento aleatorio, la parte del azar. Por el contrario, la inestabilidad del medio y el hecho de que esta fluctuación va a crecer representan una necesidad. Azar y necesidad cooperan en lugar de oponerse.

Para volver a tomar un ejemplo dado por Monod, "consideremos el guijarro que tengo en la mano". En lo que tiene de esencial, la estructura

de este guijarro puede ser deducida de los principios de la termodinámica y de la dinámica de los medios continuos, es decir, del principio de orden de Boltzmann. Es verdad que este principio no permite calcular la posición exacta de un instante dado de los átomos que la constituyen, pero ¿qué interés habría en tal cálculo?

Creo que la situación de la biosfera es análoga. La introducción de las estructuras disipativas, la sucesión de inestabilidades que implica, nos permite esperar que lo que tiene de esencial la vida es deducible de los "primeros principios".

Sin duda, sobre los otros planetas las formas que la vida tomará podrán diferir puesto que las estructuras disipativas conservan el recuerdo de las fluctuaciones que les dan origen. Pero no parece falta de razón el pensar que el fenómeno vida es tan previsible como el estado cristalino o el estado líquido.

La Recherche, junio 1972.

Bibliografía

1. J. Ben-David et R. Collins, « Social Factors in the Origins of a New Science : The Case of Psychology », *American Sociological Review*, XXXI, p. 452, août 1966.
2. J. Ben-David, « Scientific Productivity and Academic Organization in Nineteenth Century Medicine », *American Sociological Review*, XXV, 6, p. 828, décembre 1960.
3. J.D. Bernal, *Science in History*, Penguin Books, éd. de 1969, 4 vol.
4. J.D. Bernal, *L'Origine de la vie*, vol. 9 de la *Grande Encyclopédie de la nature*, Bordas, Paris, 1972.
5. L. von Bertalanffy, *Problems of Life*, London, *Watts, et New York, Wiley, 1952. Trad. française : *Les Problèmes de la vie*, Gallimard, 1961.
6. N. Bohr, *Physique atomique et Connaissance humaine*, trad. française, Gonthier, 1961.
7. Jean Brachet, « Quelques problèmes actuels en embryologie moléculaire », *l'Année biologique*, t. IX, fasc. 11-12, 1970.
8. Boltzmann, *Vorlesungen über Gas Théorie*, I, II, zweiter unv. Abd. Leipzig, 1912.
9. J.T. Bonner, *The Cellular Slime Molds*, 2^e éd., Princeton Univ. Press, New Jersey, 1967.
10. J. Cairns, G.S. Stent, J.D. Watson (editors), *Phage and the Origins of Molecular Biology*, Cold Spring Harbor, 1966.
11. M. Calvin, *Chemical Evolution Molecular Evolution towards the Origins of Living Systems on the Earth and Elsewhere*, Oxford University Press, New York, 1969.
12. G. Canguilhem, *La Connaissance de la vie*, 2^e éd., Vrin, 1965.
13. CNRS, *Les Membranes à perméabilité sélective*, Paris, 1969.
14. Ig. Cordelier, *Immunologie à l'usage des étudiants en médecine*, 2^e éd., Paris, 1971.
15. F.H.C. Crick, *Of Molecules and Men*, University of Washington Press, Seattle, 1966.

16. E. Davidson, *Gene Activity in Early Development*, Academic Press, New York, 1968.
17. Duclaux, articles dans *Actualités scientifiques et industrielles* (Hermann) :
 - a) « Diffusion dans les gels et les solides », n° 350, 1926;
 - b) « Pression osmotique », n° 515, 1937; c) « Ultrafiltration » (I et II), n° 988, 1945, et n° 1002, 1946; d) « Osmose », n° 112, 1950; e) « Dialyse », n° 1129, 1951.
18. J.T. Edsall, « History of Biochemistry and Molecular Biology », *Science*, 170, 349, 16 octobre 1970.
19. W.M. Elsasser, *Atome et Organisme*, trad. française, Gauthier-Villars, 1970.
20. E. Finn (ed.), *Membrane Science and Technology*, Plenum Press, New York, 1970.
21. D. Fleming : « Emigré Physicists and the Biological Revolution » in D. Fleming et B. Baylin (ed.), *The Intellectual Migration, Europe and America 1930-1960*, Harvard University Press, 1969.
22. S.X. Fox (ed.), *The Origins of Prebiological Systems and of their Molecular Matrices*, Academic Press, New York, 1955.
23. P. Glansdorff et I. Prigogine, *Structure, Stabilité et Fluctuations*, Masson, 1971.
24. D.E. Green et R.F. Goldberger, in *Molecular Insights into the Living Process*, Academic Press, New York, 1966.
25. C. Houillon, *Embryologie*, Hermann, Paris, 1968.
26. J.H. Humphrey et R.G. White, *Immunology for Students of Medicine*, 3^e éd., Blackwell scientific Publi., Oxford et Edimbourg.
27. F. Jacob, *La Logique du vivant*, Gallimard, Paris, 1970.
28. F. Jacob, A. Lwoff et J. Monod, « Les conférences Nobel (1965) », *Sciences*, 43-44, 35, mai-août 1966.
29. J.C. Kendrew, *Scientific American*, 216, 141, mars 1967, (compte rendu de 10).
30. J.C. Kendrew, «Some Remarks on the History of Molecular Biology», in T.W. Goodwin (ed.), *British Biochemistry Past and Present*, Academic Press, New York, 1970.
31. D.H. Kenyon et G. Steinman, *Biochemical Predestination*, McGraw-Hill, New York, 1969.
32. I.M. Klotz, *Energetics in Biochemical Reactions*, Academic Press, New York, 1957.
33. M. Klingenberg, *Essay in Biochemistry*, tome 6, p. 119, P.N. Campbell et G.D. Greville ed., Academic Press, Londres et New York.

34. T.S. Kuhn, *The Structure of Scientific Revolutions*, University of Chicago Press, 2^e éd. augmentée, 1970; trad. française : *La Structure des révolutions scientifiques*, Flammarion, 1972.
35. R.E. Lacey et S. Loeb (ed.), *Industrial Processing with Membranes*, Wiley Interscience, New York, 1972.
36. Lakatos et Musgrave (ed.), *Criticism and the Growth of Knowledge*, Cambridge University Press, 1970.
37. L.D. Landau et E.M. Lifschitz, *Statistical Physics*, Pergamon Press, New York et Londres, 1959.
38. A.L. Lehninger, *The Mitochondrion, Molecular Basis of Structure and Function*, Benjamin, New York, Amsterdam, 1964.
39. A.L. Lehninger, *Bioenergetics, the Molecular Basis of Biological Energy Transformations*, Academic Press, New York, Amsterdam 1965.
40. A. Lwoff, *L'Ordre biologique*, Laffont, 1969.
41. G. Market et H. Ursprung, *Development and Genes*, Prentice Hall, Englewood.
42. P. Medawar, *The Art of the Soluble*, Penguin Books, éd. de 1969.
43. J. Monod, *Le Hasard et la Nécessité*, Seuil, 1960.
44. N.C. Mullins, «The Development of a Scientific Speciality: the Phage Group and the Origins of Molecular Biology», *Minerva*, X, 1, p. 51, janvier 1972.
45. A.I. Oparin, *L'Origine et l'Évolution de la Vie*, 2^e éd. fr., Éd. Mir, Moscou, 1967.
46. L.E. Orgel, *The Origins of Life : Molecules and Natural Selection*, Chapman and Hall, Londres, 1973.
47. M. Polanyi : «Life's Irreducible Structure», *Science*, 160, 1308, 21 juin 1968.
48. I. Prigogine, *Introduction to Thermodynamics of Irreversible Processes*, 3^e éd., John Wiley, 1967.
49. E. Racker, *Mechanisms in Bioenergetics*, Academic Press, New York, Londres, 1965.
50. D.L. Rohlifing (ed.), *Molecular Evolution : Prèbiological and Biological*, Plenum Press, New York, 1972.
51. D.B. Roodyn et D. Wilkie, *Biogenesis of Mitochondria*, Methuen, Londres, 1968.
52. J. de Rosnay, *Les Origines de la Vie : de l'atome à la cellule*, Seuil, 1966 (rééd. 1975).
53. E. Schrödinger, *Qu'est-ce que la vie ?* Club français du livre, Paris, 1949.

54. G.S. Stent, «That Was the Molecular Biology That Was», *Science*, 160, 390, 26 avril 1968.
55. G.S. Stent, *Molecular Genetics*, Freeman, 1971.
56. A.H. Sturtevant, *A History of Genetics*, Harper and Row, 1965.
57. J. Tavlitzki : « Le code génétique », *Sciences*, n° 34, novembre 1964, et n° 35, février 1965.
58. S. Toulmin et J. Goodfield, *The Architecture of Matter*, Penguin Books, édition de 1968.
59. R. Vargues, *Immunologie clinique*, Ediscience, Paris, 1972.
60. P.V. Vignals, *Traité de biochimie générale*, p. 68, Masson, 1967.
61. J.D. Watson, *La Double Hélice*, trad. française, Laffont 1968.
62. J.D. Watson, *Biologie moléculaire du gène*, trad. française, Ediscience, 1968.
63. D.M. Weir, *Immunology for Undergraduates*, Livingstone, Londres et Édimbourg, 1970.
64. D.M. Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific Publ., Oxford-et Édimbourg.
65. E. Wolff, « Embryologie causale », in *Biologie générale*, publié sous la direction de P.P. Grassé, Masson, Paris, 1966.
66. H.V. Wyatt, «When does Information become Knowledge?», *Nature*, 235, 86, 14 janvier 1972.

