

## ALGUNOS METODOS DE IMPORTANCIA PARA ESTUDIOS DE TAXONOMIA, GENETICA Y DESARROLLO

P O R

F. ALAY (\*), R. MONTOYA (\*), M. AMIN (\*), I. HERMOSILLA (\*)

### R E S U M E N

Se señala la importancia de: Inmunogenética, electroforesis e histoquímica como métodos adecuados para taxonomía, genética y desarrollo. Se describen las técnicas y su forma de aplicación e interpretación. Se discuten sus ventajas e inconvenientes y se indican ejemplos de su aplicación a grupos animales.

### A B S T R A C T

The importance of Immunogenetics, Electroforesis and Histochemistry are signaled as good methods devoted to solve problems of: taxonomy, genetics and development.

The technique, interpretation and use are commented. Examples in animals are presented.

Todo ser viviente está constituido por un enorme conglomerado de moléculas proteicas. Cada una de ellas presenta una estructura que obedece a un comando genético el que determina a su vez su secuencia primaria, es decir, el orden de los aminoácidos que la constituyen (Allende J., 1972).

Esto ha quedado establecido desde el descubrimiento realizado por Watson y Crick en 1953 (Watson J. D., Crick F. H. C. 1953), ampliado y confirmado posteriormente por numerosos autores (Taylor, J. H., 1965).

El gen traduce su mensaje en fenotipo, por lo tanto cada una de las proteínas elaboradas por los genes puede ser considerada como tal.

Genética, Taxonomía y Desarrollo trabajan en base a fenotipos, es decir, estructuras visibles a través de métodos macroscópicos o microscópicos: forma, tamaño, color, estructura, longitud, etc., constituyen en gran medida su quehacer, siendo éste desde luego el problema biológico central: determinación de la forma. Sin embargo, los métodos de análisis referido (muy poco alejados de las observaciones iniciales de Mendel, Linneo o Spemann) presentan una serie

(\*) Departamento de Biología Celular. Instituto de Biología. Universidad de Concepción. Casilla 1367. Concepción, Chile.

de inconvenientes. Muchas veces no existe una relación lineal o directa entre el gen y su producto (el carácter fenotípico); la mayoría de los caracteres son consecuencia de la interacción de un gran número de genes y esto puede llevar a error; es decir, cuando analizamos un carácter no necesariamente analizamos un solo gen. Otro problema inherente a este método de análisis lo constituyen las relaciones de dominancia y/o epistasis que puedan ocurrir, lo que nuevamente puede llevar a error. Finalmente, no debemos olvidar la influencia que el medio ambiente ejerce sobre la expresión de un carácter.

El conjunto de estos hechos puede llevar a confusiones lamentables cuando se hacen análisis taxonómicos, genéticos o embriológicos en un nivel de profundidad mayor (Petit C., Prévost, G., 1974; King, R. C., 1965).

La situación ideal sería poder visualizar de alguna manera el producto del gen, es decir, poder identificar la proteína elaborada por un gen determinado. Esto trae consigo una serie de ventajas ya que en relación a las situaciones señaladas anteriormente, las proteínas se comportan desde el punto de vista de la dominancia como codominantes (salvo algunas excepciones), por lo tanto, cada una se expresa en el híbrido.

Desde el punto de vista de la interacción ellas participan secuencialmente, lo que facilita el análisis.

Otra ventaja adicional es que muchas no son influidas por el medio ambiente: una situación de carencia alimenticia determinará emaciación, pero en ningún caso impedirá que se manifieste por ejemplo el grupo sanguíneo A, B o 0 de un sujeto o que sus proteínas musculares cambien cualitativamente. Puede que varíen en número pero continuarán siendo las mismas que antes de la emaciación.

Finalmente, los genes y las proteínas que son codificadas por ellos presentan la capacidad de mutar, es decir, cambiar su secuencia de bases produciéndose con esto un ordenamiento aminoacídico distinto al de la proteína original. Esto último es importante pues determina la aparición de estados alternativos del gen y por lo tanto de la proteína codificada. Este hecho permite Variación, fuente primaria de las ciencias que nos preocupan (Watson, J. D., 1974; Petit, C., 1974; King, R. C., 1965).

Afortunadamente existen métodos que permiten estudiar éstas y otras variables estructurales y esto ha traído como consecuencia un avance considerable en las ciencias biológicas: ha permitido visualizar diversos genes y su acción durante el desarrollo, ha ampliado y posibilitado enormemente los estudios de genética poblacional de diversas especies, ha permitido contribuir valiosamente al desarrollo de la Taxonomía y Filogenia.

Los métodos a que haremos referencia se encargan de una u otra manera de detectar estados alternativos de proteínas bien establecidas.



Fig. 1.— Distribución geográfica de las frecuencias génicas del gen  $I^B$ , que da origen al grupo sanguíneo B del hombre (Th. Dobzhansky, 1962).

Los métodos son los utilizados por una especiación reciente de la Genética (Inmunogenética) y diversas formas de electroforesis y técnicas histoquímicas. Queremos hacer referencia a estas técnicas debido a que ellas están siendo utilizadas en el Departamento de Biología Celular y algunas han dado lugar a publicaciones anteriores (Alay, F., 1974-1975).

*INMUNOGENETICA*: Este término fue utilizado por primera vez por Irwin (1947-1974) y ha quedado como un concepto establecido. En realidad, su iniciador fue Landsteiner con el hallazgo de los grupos sanguíneos en el hombre y que éstos obedecían a un control genético (Boyd, W. C., 1966). Brevemente su método consiste en incorporar técnicas de la Inmunología a estudios genéticos. Se basa en la particularidad que presentan las estructuras macromoleculares de comportarse como antígenos, es decir, sustancias que incorporadas al organismo hacen que éste elabore anticuerpos capaces de reconocer específicamente a este antígeno o a sus especificidades antigénicas. Desde este punto de vista podemos considerar que un glóbulo rojo está constituido por un mosaico de antígenos. Este mosaico será en algunas de sus particularidades característico de ese organismo y no de otro; otras particularidades del mismo mosaico serán características no ya del individuo sino de la especie. A su vez, algunas de esas particularidades de especie estarán compartidas con otra especie filogenéticamente relacionada y no con especies que están más alejadas.

Se puede establecer entonces un esquema de vecindad y alejamiento progresivo.

Un ejemplo interesante de esto se encuentra en los sistemas de grupo sanguíneo en el hombre: Brevemente diremos que existe un centro de dispersión del grupo sanguíneo B en Asia en que la frecuencia del gen es alta y desde este centro su frecuencia baja a medida que nos alejamos hacia el Sur Este. A la inversa, el grupo sanguíneo A presenta su más alta frecuencia en la región centro europea y la frecuencia de este gen disminuye hacia el Noroeste (Ver Figuras Nos. 1 y 2). Las zonas de contacto están dadas por países en que la frecuencia de los genes A y B es más o menos equivalente. Indudablemente esta observación es de interés desde el punto de vista antropológico y contribuye a conocer la forma probable en que grupos humanos hubieren podido establecerse en determinadas regiones geográficas y además sus posibles desplazamientos.

También los grupos sanguíneos humanos son utilizados desde el punto de vista filogenético. Es interesante la observación sobre la presencia de A, B, M y N en gorilas, chimpancés y otras especies de antropoides. Esto revela que además de las similitudes anatómicas y morfológicas que indican proximidad filética entre hombres y monos existen también similitudes desde el punto de vista molecular (Dobzhansky, Th., 1962).

Estudios semejantes se han realizado y realizan en numerosas especies: bovinos (Stormont et al., 1951), cerdos (Andresen, E., 1962), equinos (Stormont et al., 1964), cánidos (Cohen, C. et al., 1953), ratas



Fig. 2.— Distribución geográfica de las frecuencias génicas del gen  $I^A$ , que da origen al grupo sanguíneo A del hombre (Th. Dobzhansky, 1962).

silvestres (E. Savage et al., 1971), ratones (Hoecker et al., 1965), aves domésticas en general (Gilmour, R. G. 1969), reptiles, anfibios (Hildemann, 1962), peces (Herzberg, A. 1975).

Aquí cabe incluir el concepto de marcador genético, es decir cada alelo (de grupos sanguíneo en este caso), es detectado (marcado genéticamente) mediante un reactivo (suero iso o hetero inmune) elaborado previamente con técnicas descritas en otra publicación (Alay, F., 1975). De esta manera se puede disponer de un stock de sueros elaborados que servirían por una parte para describir antigénicamente a una especie y que permitirían por otra establecer relaciones de parentesco con especies afines.

Si pensamos ahora que aquel antígeno (generalmente una proteína), que segrega en forma mendeliana obedece a un gen y a su vez éste está situado en un cromosoma, se contribuye también con este conocimiento a la elaboración del mapa genético de la especie que en ese momento nos preocupa.

La Inmunogenética es también una valiosa herramienta para el estudio de la llamada Fenogenética o genética fisiológica que se confunde con la genética del desarrollo. Si bien un organismo tiene un conjunto de genes éstos no trabajan simultáneamente; en un momento dado y dependiendo de la fase del desarrollo ellos elaboran determinados productos (proteínas) necesarios para esa etapa y no para otra.

La diferenciación proteica constituye entonces uno de los focos de atención para los biólogos del desarrollo. Como ya dijimos, el desarrollo de un organismo multicelular a partir de un óvulo hasta llegar a la forma adulta, involucra la interacción de moléculas a todos los niveles de organización y por ende, la entrega progresiva de la información genética contenida en el DNA en los diversos estados del desarrollo. Para comprender la embriología, debemos conocer algo de las moléculas que participan.

Las reacciones de detección empleadas en Inmunogenética son generalmente de aglutinación directa e indirecta o de lisis. Técnicas relativamente simples que facilitan el trabajo. También se utilizan las reacciones de precipitación en geles de agar en que la complementación antígeno anticuerpo se hace por difusión y se visualiza por la aparición de un arco de precipitación. Esta técnica denominada Inmunodifusión (Crowle A. J., 1973) ha sido empleada también para establecer relaciones de vecindad entre el hombre y vertebrados próximos y alejados.

Para terminar, diremos algunos conceptos sobre la utilidad que presentan ciertos extractos de vegetales para identificar estructuras antigénicas situadas en la superficie de los glóbulos rojos. Nos referimos a las lectinas: sustancias capaces de provocar la aglutinación específica de los glóbulos rojos. La propiedad de estas sustancias y su

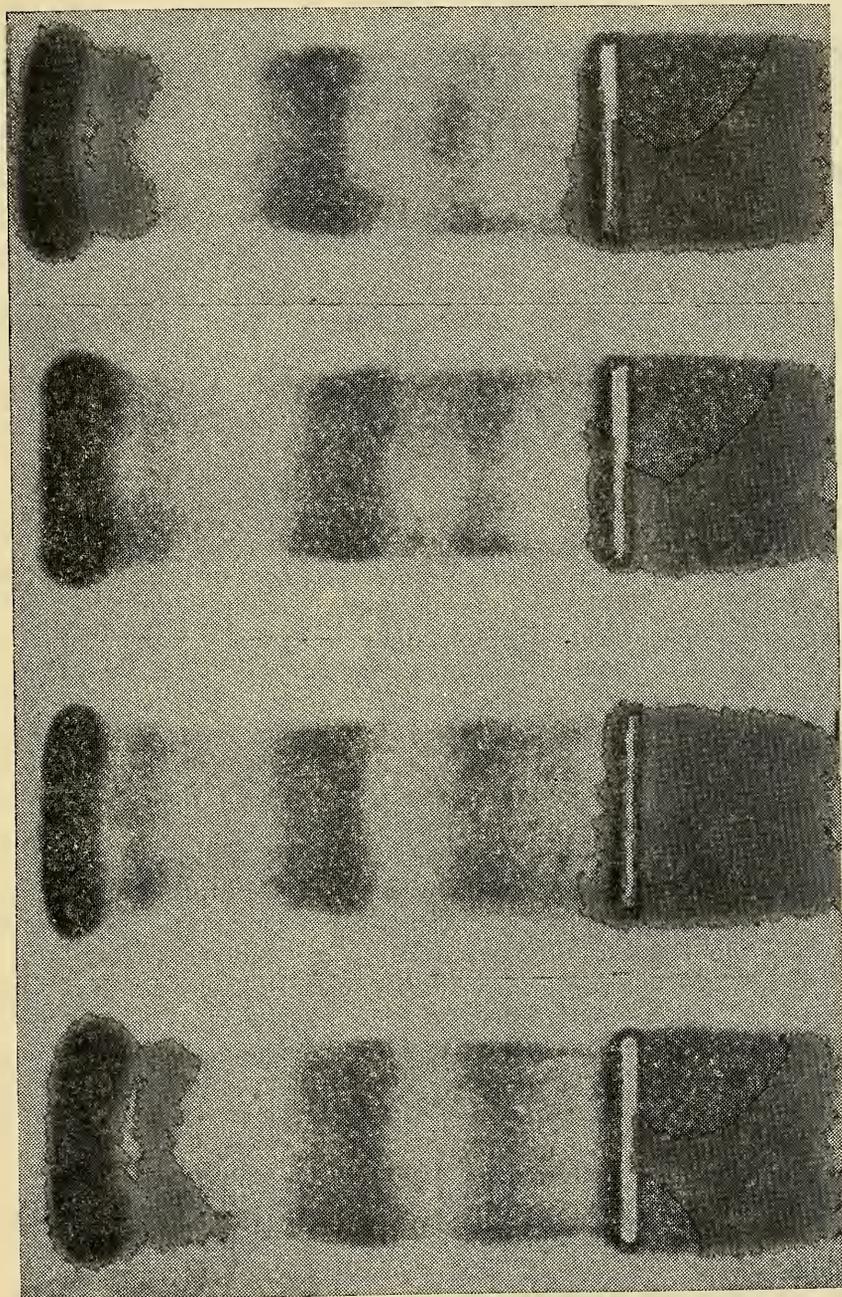


Fig. 3.— Separación electroforética de sueros de gallina. Soporte agar-agar Buffer Veronal. pH. 8.6. Se aprecian: Albúminas; globulinas: alfa, beta, gamma.

nombre se lo debemos a Boyd (Boyd, W. C., 1966) quien ha obtenido extractos de vegetales diversos capaces de aglutinar e identificar los grupos sanguíneos humanos A, B, M y N. El uso de estos extractos permite reemplazar a los inmunosueros que en general son difíciles de preparar.

#### *ELECTROFORESIS Y TECNICAS HISTOQUIMICAS:*

El método electroforético fue descubierto por Tyselius y su difusión actual es enorme. El método consiste en hacer pasar una corriente eléctrica a través de un soporte (agar-agar, almidón, acetato de celulosa, acrilamida) (Castagnino, J. M., 1968), sobre el cual se ha depositado previamente una muestra (generalmente proteica, suero sanguíneo).

La técnica consiste en separar las proteínas de la muestra mediante un campo eléctrico cuyo voltaje es constante y durante un período de tiempo también constante. Se obtiene así una "corrida electroforética" y aquellas proteínas semejantes (alélicas) que difieran ligeramente en su estructura primaria y que presenten por esto una carga eléctrica ligeramente distinta, migrarán también a distinta velocidad lo que nos permitirá distinguir proteínas rápidas, medianas y lentas. Esto ocurre con las transferrinas, haptoglobinas, albúminas, etc. que se detectan tiñendo el soporte con colorante para proteínas. Un ejemplo se ve en la Figura N° 3, en que se aprecia una separación electroforética de suero de gallina realizada sobre gel de agar, en el Laboratorio de Genética de nuestro Departamento.

Otro aspecto interesante y que relaciona dos métodos es el encargado de la detección de Isoenzimas, es decir, enzimas que cumplen la misma función pero que difieren ligeramente en su estructura primaria y por lo tanto, en su carga eléctrica (Latner, A. L. et al., 1968). El método de separación de éstas es el mismo pero las técnicas de coloración son histoquímicas (Pearse, A. G., 1968).

Habrá primero una electroforesis y luego se procederá a la tinción del soporte (que lleva la proteína problema) mediante técnicas específicas para detectar la Isoenzima que en ese momento nos preocupa.

Evidencias histoquímicas y electroforéticas utilizadas en el análisis de enzimas durante el desarrollo embrional evidencian cambios cuali cuantitativos en las moléculas presentes; últimamente se ha establecido que la actividad de la fosfatasa alcalina puede variar desde el óvulo a los primeros clivajes y elevarse marcadamente en la gastrulación y en pluteus. El por qué de este aumento de actividad se debería a una forma molecular diferente a la presente en el óvulo y en los clivajes tempranos del erizo de mar (Pfohl, 1975) (Figuras Nos. 4 y 5).

Por otro lado, también es interesante para el desarrollo lo que ocurre en la molécula de Hemoglobina: desde mucho tiempo se sabe que en muchos vertebrados existen diferentes hemoglobinas en los

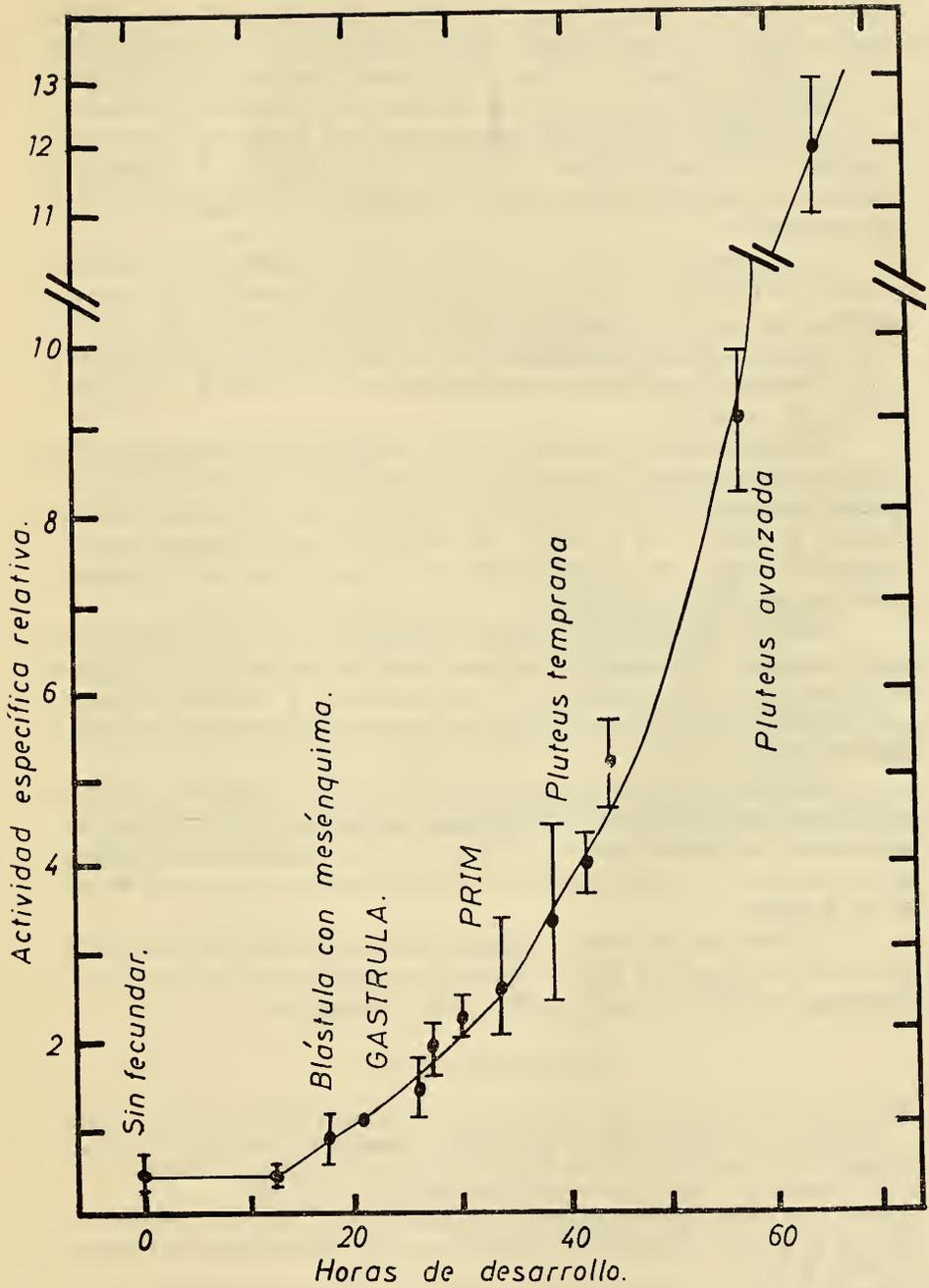


Fig. 4.— Actividad de la fosfatasa alcalina durante el desarrollo del erizo de mar (Pfhof, 1975).

animales fetales y adultos y que durante el desarrollo la hemoglobina fetal circulante es reemplazada gradualmente por una hemoglobina de tipo adulto (Gratzer y Allison 1960). Estudios en anfibios utilizando electroforesis demuestran que en anfibios parecen existir dos hemoglobinas larvales y tres adultas (Jurd y Maclean 1970). En aves se han separado diferentes especies de hemoglobinas a partir de embriones tempranos y tardíos, pollos recién desovados y pollos adultos (Shimizu, 1972).

La biología molecular no sólo nos ha enseñado a aislar proteínas específicas sino que ha provisto a la embriología con nuevos métodos para estudiar la naturaleza y la síntesis de las macromoléculas presentes en los organismos. Tiene plena vigencia lo declarado por J. Brachet: La diferenciación celular es un problema de diferenciación de proteínas.

La aplicación y utilidad que el método electroforético y las técnicas histoquímicas ofrecen es considerable: son utilizables en vegetales, invertebrados y vertebrados en general y su aplicación permite abordar problemas de genética, de desarrollo o de filogenia con la ventaja de que no es necesario elaborar, como el caso de la Inmunogenética, reactivos específicos.

Ella ha permitido un avance enorme en el conocimiento del mapa genético del hombre y numerosas especies, ha permitido también hacer estudios poblacionales y/o de descendencia y estudiar la importancia que determinadas isoenzimas presentan a lo largo del desarrollo embrionario.

Otra variante que este método ofrece y que también presenta excelentes posibilidades es la Inmunolectroforesis en que se combina esta técnica de separación proteica y su visualización posterior mediante una reacción de precipitación a través de un antisuero que difunde en el soporte.

A través de esta breve exposición hemos querido dar una visión de conjunto respecto a algunos métodos que pueden contribuir enormemente al avance de estos aspectos de la Biología.

#### BIBLIOGRAFIA

- Allende, J. E. 1972. Biosíntesis de proteínas y el Código Genético. Edit. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington D. C.
- Watson, F. D. and Crick, F. H. C. 1953. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.
- Taylor, J. H. 1965. Selected papers on molecular genetics. Ed. Acad. Press. N. Y.
- Watson, F. D. 1974. Biología Molecular del gen. Ed. Fondo Educativo Interamericano S. A.
- Petit, C., Prévost, G. 1974. Genética y Evolución. Ed. Omega. Barcelona.
- King, R. C. 1965. Genetics. Ed. Oxford University Press.
- Irwin, M. R. 1974. Comments on early history of immunogenetics. *Anim. Blood. Grps. biochem. Genet.* 5: 65-84.
- Irwin, M. R. 1974. Inmunogenetics. *Adv. in Genetics* Vol. I: 133-157.
- Boyd, W. C. 1966. Fundamentals of Immunology. Ed. Intersciencias Pub.
- Dobzhansky, Th. 1962. Evolución Humana. Ed. Univ. de Chile, S. A.

- Ycas, M. K., 1949. Studies of the development of a normal antibody and Cellular antigens in the blood of sheep. *J. Immun.* 61: 327-347.
- Stormont, C., Owen, R. D., Irwin, M. R. 1951. The B and C system of bovine blood groups. *Genetics* 36: 134-161.
- Adresen, E. 1962. Blood groups in pigs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 97: 205-225.
- Stormont, C., Susuki Y. 1964. Genetic systems in horses 50: 915-929.
- Cohen Carl, J. L. Fuller (1953). The inheritance of blood types in the dog. *J. of Heredity* 44, N<sup>o</sup> 6: 225-228.
- Alay, F., Bittner, M. 1974. Extractos vegetales de especies chilenas como posibles marcadores genéticos en eritrocitos de gallinas. *Bol. Soc. Biol. de Concepción.* Tomo 48: 475-483.
- Alay, F. 1975. Obtención de sueros isoimunes para el locus A en gallinas. *Bol. Soc. Biol. de Concepción.* Tomo 49. En prensa.
- Savage, E., Cameron, D. G. 1971. Blood group complexity: the Pm locus in *Peromyscus maniculatus*. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 2, 1: 23-30.
- Gilmour, D. G. 1969. Blood group research in chickens *Agric. Sci. Review* Vol. 7,4: 13-22.
- Hildemann, W. H. 1962. Immunogenetic studies of amphibian and reptiles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 97: 139-152.
- Herzberg, A. 1975. The use of carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) instead of rabbit as antibody donor in immunological research on Fishes. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.* 6: 215-220.
- Hoecker, G., Pizarro, 1965: International symposium on tissue transplantation: The histocompatibility antigens. Ed. Universitaria S. A.: 54-71.
- Crowle, Alfred J. 1973. Immunodiffusion. Ed. Acad. Press. N. Y. London.
- Castagnino, J. M. 1968. Electroforesis. Ed. Universitaria Bs. Aires.
- Latner, A. L., Slillen, A. W. 1968. Isoenzymes in biology and medicine. Ed. Acad. Press. N. Y.
- Pearse, A. G. E. 1968: Histochemistry. Ed. Little, Brown and Company.
- Pfohl, R. J. 1975. Alkaline Phosphatase of sea Urchin Embryos Chromatographic and Electrophoretic Characterization. *Dev. Biol.* 44 N<sup>o</sup> 2: 333-345.
- Jurd, R. D., Maclean, N. 1970. An immunofluorescent study of the haemoglobins in metamorphosis of *Xenopus laevis* *J. of Embriology and Experimental Morphology* 23: 299-309.