

Ciencia en la frontera

Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ



Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

DIRECTORIO
Felipe Fornelli Lafón
Rector

Héctor Reyes Leal
Secretario General

Javier Llera Pacheco
Director General de Investigación Científica

Ernesto Morán García
Director del ICB

Eduardo Pérez Eguía
Coordinador de Investigación del ICB

CONSEJO EDITORIAL
Francisco Molinar Holguín
Thomas Kretzschmar Steinle

Helvia Pelayo Benavides
Emilio Álvarez Parrilla
Alejandro Martínez
Luis Fernando Plenge
Joaquín Rodrigo García
Antonio de la Mora
Hugo Staines Orozco
Esaúl Jaramillo
Leonel Barraza Pacheco

COORDINADOR
Luis Fernando Plenge

CORRECCIÓN
Mayola Renova González

COMPOSICIÓN
César Muñoz Carrasco

CONSEJO EDITORIAL INTERNACIONAL

Álvaro Álvarez

Fac. Ciencias, Matemáticas, UABC,
Ensenada, B. C.

Luis Botana López

Fac. de Veterinaria, Depto. de Química Física.
Universidad de Santiago de Compostela,
España.

Francisco Fernández Belda

Depto. de Bioquímica y
Biología Molecular (A), Universidad
de Murcia, Murcia, España.

Alex Fragoso Sierra

Fac. de Química. Universidad
de La Habana, Cuba.

Jorge Gardea Torresdey

Chemistry, UTEP, El Paso, Texas.

Armando Gómez Puyou

Investigador Emérito. Instituto de Fisiología
Celular, Depto. Bioquímica, UNAM.
México, D. F.

Gustavo González

Ciencia de los Alimentos, SIAT,
Hermosillo, Sonora, México.

Louis Irwin

Chemistry, UTEP, El Paso, Texas.

José Luis Ochoa

CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Esther Orozco

CINVESTAV, México, D. F.
Biomedicina Molecular.

María Jesús Periago

Depto. de Bromatología e Inspección
de Alimentos, Universidad de Murcia,
Murcia, España.

Gaspar Ros Berrueto

Depto. de Bromatología e Inspección
de Alimentos, Universidad de Murcia,
Murcia, España.

Rocío Salceda Sacanelles

Instituto de Fisiología Celular, Depto.
Neurociencias, UNAM, México, D. F.

Fernando Soler

Depto. de Bioquímica y Biología Molecular
(A), Universidad de Murcia, Murcia,
España.

Marieta Tuena de Gómez Puyou

Investigadora Emérita. Instituto de Fisiología
Celular, Depto. Bioquímica, UNAM.
México, D. F.

José Vázquez Tato

Fac. de Ciencias, Depto. de Química Física.
Universidad de Santiago de Compostela,
España.

Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ / Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Dirección General de Investigación Científica. Vol. 1, no. 2 (diciembre 2000). Ciudad Juárez, Chih.: UACJ, 1999.

v.; 21 cm.

Seriada

1. Ciencias Puras – Publicaciones Periódicas
2. Ciencias Aplicadas – Publicaciones Periódicas
3. Ingeniería – Publicaciones Periódicas

Q4.R48 1999

505.R48 1999

Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ es una publicación seriada del Instituto de Ciencias Biomédicas a través de la Dirección General de Investigación Científica de la UACJ, año 2, núm. 2, diciembre de 2000, precio por ejemplar: \$50.00 pesos en México y \$10.00 dólares al extranjero (incluye gastos de envío). Publicidad, anuncios y suscripciones, dirigirse a: Instituto de Ciencias Biomédicas, *Ciencia en la frontera*: revista de ciencia y tecnología de la UACJ, Edificio T de Posgrados, Anillo Envoltante del Pronaf y Estocolmo, C. P. 32310. Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Tel. (656) 688 18 85, fax (656) 688 18 83. Hecho en México/Printed in Mexico.

Derechos Reservados © UACJ

Los manuscritos propuestos para publicación en esta revista deberán ser inéditos y no haber sido sometidos a consideración a otras revistas simultáneamente. Al enviar los manuscritos y ser aceptados para su publicación, los autores quedan que todos los derechos se transfieren a *Ciencia en la frontera*: revista de ciencia y tecnología de la UACJ, quien se reserva los de reproducción y distribución, ya sean fotográficos, en micropelícula, electrónicos o cualquier otro medio, y no podrán ser utilizados sin permiso por escrito de *Ciencia en la frontera*: revista de ciencia y tecnología de la UACJ, véase además notas para autores.

Permisos para otros usos: el propietario de los derechos no permite utilizar copias para distribución en general, promociones, la creación de nuevos trabajos o reventa. Para estos propósitos, dirigirse a *Ciencia en la frontera*: revista de ciencia y tecnología de la UACJ, correo electrónico fplenge@uacj.mx.

CONTENIDO

Biomedicina y biología experimental

Resúmenes/Abstracts 5

Presentación

Fernando Plenge Tellechea 9

Alteración de la señal de calcio en músculo cardíaco

Fernando Soler y Francisco Fernández Belda 11

Hipertermia maligna, un síndrome ocasionado por disturbios en la homeostasis celular del Ca²⁺ en músculo esquelético

Fernando Plenge Tellechea, Joaquín Rodrigo García y Javier Vargas Medrano 17

Supresión de centrosomas paternos durante la meiosis en ovocitos

José Luis Stephano y Meredith Gould 29

Enzyme and Chemical disaggregation of rabbit zona pellucida embryos

Héctor Serrano, Yolanda Gutiérrez Ramírez, Ismael Fuentes Mascorro, María Dolores García Suárez 33

La importancia nutricional de los antioxidantes vegetales: composición química, absorción, metabolismo y actividad biológica

Joaquín Rodrigo García, Gaspar Ros Berruezo, María Jesús Periago Castón, Francisco Molinar Holguín, Fernando Plenge Tellechea e Isabel Martínez Valverde 37

La fluidez membranal en eritrocitos de niños severamente desnutridos

Carolina Campos Muñiz, Pablo Rangel Silva, Miguel Ramos Motilla y José Luis Gómez Olivares 45

Relación entre la intolerancia a la glucosa y algunos factores de riesgo a la diabetes mellitus tipo 2

Gloria Ruiz Guzmán, Alma Guadalupe Arellano Meneses, Marta Ruiz, Arturo Preciado López y Arturo Acevedo Gómez 53

General aspects of the polymerase chain reaction

Ma. Teresa Mata, Ricardo López Romero, Genaro Patiño, María Dolores García Suárez, Héctor Serrano 59

La comunicación química en los organismos

Jesús Montemayor, Mohammed Badii, Adriana Flores y Carlos Aguilera65

Propagación in vitro de agarita (berberis trifoliata moric) un arbusto nativo del desierto chihuahuense

Francisco Molinar, Wayne A. Mackay, Marisa M. Wall,
Joaquín Rodrigo García y Manuel Cárdenas71

Análisis con citometría de flujo de los diferentes tipos de timocitos en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia

Rocío Ortiz Muñiz, Leticia Cortés Martínez, José Luis Gómez Olivares,
Cristina González Torres, Edith Cortés Barberena77

CONTENTS

Biomedicine and biology experimental

Presentation

Fernando Plenge Tellechea 9

Altered calcium signaling in cardiac muscle

Fernando Soler and Francisco Fernández Belda 11

During each cardiac action potential a small Ca^{2+} influx enters from the extracellular space into the myocyte cytosol. This initial Ca^{2+} entry induces an additional Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum store which is the signal for muscle contraction. The ATP-dependent Ca^{2+} -pump and the Na^+ - Ca^{2+} exchanger allow muscle relaxation by decreasing the level of cytosolic Ca^{2+} . Heart failure is a complex disorder associated with a severe loss of the cardiac contractile function. Since Ca^{2+} is the contractility signal, the Ca^{2+} regulatory proteins are of potential interest as a target for gene therapy. The loss of cardiac myocytes via programmed cell death or apoptosis is also believed to play an important role in the progression of heart failure. The use of anti-apoptotic drugs with inhibitory action on specific mitogen-activated protein kinases and on the caspase family of cysteine proteases may be of therapeutic interest. These novel approaches may have clinical relevance in the next future.

Malignant hyperterm, a syndrom caused from disturbs in the cellular homeostasis of Ca^{2+} in the skeletal muscle

Luis Fernando Plenge, Javier Vargas Medrano y Joaquín Rodrigo García 17

Malignant hyperthermia (HM) is a disorder of the skeletal muscle in which certain anesthetic agents trigger a sustained elevation in the myoplasmic Ca^{2+} concentration. This Ca^{2+} concentration activates a metabolic and contractile activity. Different studies have identified that the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} releases a channel gene known as ryanodine receptor (RyR1). The RyR1 is considered the defective site. A mutation in this protein results in an altered excitation-contraction coupling. In concrete, this disorder is caused by the change from Cys to Arg in the position 615. This change can result in an alteration of the regulating myoplasmic Ca^{2+} concentration. Since the myoplasmic Ca^{2+} concentration controls muscle contractile and metabolic activity, it is evident that even under an alteration in the control of myoplasmic Ca^{2+} *in vivo* could have significant physiological consequences. These alterations could consist in cellular metabolism like anaerobic metabolism, tachycardian, respiratory acidosis and other types of alterations. The individual susceptibility could release an episode of HM in the presence of volatile anesthetics such as halothane and other related compounds. Several studies in humans and animals suggest that dantrolene sodium is a depolarizing muscular relaxant commonly used as an antidote during an episode of HM. Dantrolene causes a nonmassive release of Ca^{2+} from the reticulum sarcoplasmic cisterns. In consequence, the normal levels of Ca^{2+} myoplasmic of the sarcoplasmic reticulum are then reestablished.

Suppression of paternal centrosomes during oocyte meiosis

José Luis Stephano and Meredith Gould 29

There are four lines of evidence that MAP kinase (MAPK) suppresses sperm centrosome development during meiosis in the marine worm *Urechis caupo*.¹ The period of MAPK activation during meiosis coincides with the period of sperm centrosome suppression.² When MAPK activity decreases after meiosis, the sperm aster grows and migrates towards the center of the oocyte.³ When MAPK activation is inhibited with U0126 or PD98059 the sperm aster grows prematurely during meiosis, and the sperm nucleus is dragged towards the center of the oocyte.⁴ When MAPK activation is inhibited by a different method (a pH change), sperm centrosomes also form asters prematurely and the sperm pronuclei migrate towards the oocyte center.⁵ When MAPK activation is inhibited in oyster and starfish oocytes, the same effects are observed.⁶ A review of the literature reveals that MAPK is also active from germinal vesicle breakdown until formation of the second polar body in human, bovine, mouse, *Xenopus*, tunicate, and clam oocytes, and the sperm asters (oocyte asters in mouse) grow during or after second polar body formation. On the basis of these data and the experimental data from *Urechis*, oyster and starfish, we propose that sperm centrosome suppression by MAPK is a universal mechanism.

Enzyme and Chemical disaggregation of rabbit zona pellucida embryos

Héctor Serrano, Yolanda Gutiérrez Ramírez, Ismael Fuentes Mascorro 33

For a long time, one of the most difficult Assisted Reproduction strategies has been the optimization in the number of offspring's obtained from a single embryo. Techniques such as embryo cutting, multiovarian embryo transfer, nuclear transfer (cloning) or simply hormone ovarian stimulation have been used to reach this goal. Unfortunately, all these techniques are time consuming and require either specialized equipment or a well-trained technician. Here we report a simple method that implies the zona pellucida dissolution that can be applied even to mucin covered embryos. GnRH-primed female rabbits were mated with a fertile buck and embryos were collected. Excised reproductive apparatus from ovaries to the uterus were washed with warm PBS. Embryos were then separated into 6 treatment groups: NaOH-TC199 medium, alkaline TC199 medium, TC199 medium added with fresh NaOH, Trypsin treatment, chymotrypsin treatment or pronase-treated embryos. Neither trypsin nor chymotrypsin was able to dissolve the mucin coat without blastomere damage. Alkaline medium are able to dissolve the mucin coat as efficiently as freshly added NaOH but it affects blastomere viability. Only NaOH saline dissolves all embryo coats in a time that does not affect embryo viability. Zona-free blastomeres can be isolated by mechanical disruption of the unions between them.

The nutritional importance of plant antioxidants chemical composition absorption, metabolism and Biological activityJoaquín Rodrigo García, Gaspar Ros Berruezo, María Jesús Periago Castón,
Francisco Molinar Holguín, Fernando Plenge Tellechea
e Isabel Martínez Valverde 37

Key words: Antioxidants, phenolic compounds, cardiovascular and oncogenic diseases
In present times, human nutrition has become more relevant in the welfare and prevention of different diseases. Therefore, there are more studies on the benefits of diets rich in phenolic compounds and the prevention of cardiovascular and oncogenic diseases. These phenolic compounds are found in vegetables, fruits and red wines and should be an important part of the human diet. Their appropriate levels must be maintained in the blood stream to obtain the

expected benefits. Different studies in Mediterranean countries where the diet is rich in vegetables, fruits and red wine, have shown that the incidence of these diseases are much lower than in countries where the diet is rich in carbohydrates and fat. Similarly, there are other important foods with high levels of this compounds like berries, onions, tea beverages and apples. The state of Chihuahua is one of the largest producers of apples in México. The authors believe that the regular consumption of apples would represent a benefit in the food habits and therefore in the potential reduction of cardiovascular and oncogenic risks.

The erythrocyte membrane fluidity in childrens with protein-calorie malnutrition

Carolina Campos Muñiz, Pablo Rangel Silva, Miguel Ramos Motilla
y José Luis Gómez Olivares 45

The aim of the present study was to investigate the changes on erythrocyte membrane fluidity in childrens with protein-calorie malnutrition. The determination of membrane dynamic (by fluorescence polarization) showed decreases due principally to an increase in the intramembrane cholesterol/phospholipid ratio. This study suggest that protein-calorie malnutrition has a marked effect on the dynamic and the lipid composition of erythrocyte membranes, which could affect cell functions.

Relationship between impaired glucose tolerance and some risk factors to type 2 diabetes mellitus

Gloria Ruiz Guzmán, Alma Guadalupe Arellano Meneses, Marta Ruiz,
Arturo Preciado López y Arturo Acevedo Gómez 53

The diabetes mellitus is one of the most important diseases in the world and in our country. It is consider as a major public health problem due its medical, economical and social consequences. Type 2 diabetes mellitus is the most frequent type of diabetes and it is estimated that approximately 10 to 15 % of the mexican population is affected by this. It has been proposed that there are some factors that can accelerate the beginning of the disease, therefore the study and modification of these factors in asymptomatic subject can delay its development and offers a better life to the patients. In this study we analyzed the importance of some risk factors in relation to the glucose tolerance in an asymptomatic population. We found that the hereditary antecedents of diabetes, over weight, sex, age, diet, stress and physical activity can affect the glucose tolerance.

General aspects of the polymerase chain reaction

Ma. Teresa Mata, Ricardo López Romero, Genaro Patiño,
María Dolores García Suárez, Héctor Serrano 59

Polymerase chain reaction (PCR) is one of the commonly used techniques in Molecular Biology laboratories. Even when theoretically simple, it can be used for many different goals ranging from simple gene isolation and sequencing to complex problems (differential gene expression, genetic susceptibility, and physiological responsiveness. Here we review the more general characteristics and necessities for a PCR to consider.

Chemical Communication in Organisms

Jesús Montemayor, Mohammed Badii, Adriana Flores
y Carlos Aguilera 65

The organism's life requires, in a fundamental manner, the precise reception of environmentally based multiple traits and variations. In response to this end, during the path of the evolution, organs sensible to different chemical substances that could be transported in both air and water or sensitive to the temperature, light and sound have been developed.

Clonal propagation of *Agarita (berberis trifoliata moric): a commercially-feasible chihuahuan desert shrub*

Francisco Molinar, Wayne A. Mackay, Marisa M. Wall,
Joaquín Rodrigo García y Manuel Cárdenas 71

Key words: micropropagation, agarita, woody plant media, plant hormones.

Experiments were conducted to develop a clonal propagation system for agarita (*Berberis trifoliata* Moric). Actively growing agarito shoots were collected from a mature plant at the Texas A&M University Research and Extension Center in El Paso and successfully established on a basal medium consisting of woody plant medium (WPM) salts and Murashige and Skoog vitamins, sucrose at 30 g L⁻¹, and 0.8% Phytagar supplemented with 11.1 µM BA. Cytokinins (benzyladenine, kinetin, and thidiazuron), subculture period, and age of cultures were tested. The optimal shoot proliferation conditions were WPM basal medium supplemented with 5.5 µM BA and a subculture period of 4 weeks. Culture age did not affect shoot proliferation but did affect rooting. Preliminary experiments with 1.0 11.1µM NAA resulted in nearly 100% rooting of microshoots < 6 months old. Shoots from 21 month old cultures had to be placed on a cytokinin-free medium before successful rooting. On basal medium supplemented with NAA (5.4 µM), 68% of the microshoots rooted with an average of 1.2 secondary roots per microshot. Chemical names used: N-(phenylmethyl) 1H purin-o-amine (BA); 1-naphtaleneacetic acid (NAA); N-Phenyl-N-1,2,3-thydiazol-5ylurea (thidiazuron or TDZ); 6 furfulaminopurine (kinetin).

Flow cytometric analysis of thymocyte subpopulations in severely malnourished rats during lactation

Rocío Ortiz Muñiz, Leticia Cortés Martínez, José Luis Gómez Olivares,
Cristina González Torres, Edith Cortés Barberena 77

Malnutrition is widely distributed throughout the world. Experimental models have been useful to study the effects of malnutrition at different levels and ages. The thymus is crucial to T cell development. Thymus atrophy is a consequence of nutritional deprivation. The aim of this study was to determine if severe malnutrition is associated with an altered representation of thymocyte subsets in experimentally malnourished rats during lactation. Thymuses were obtained from malnourished rats at weaning. The cells were identified by flow cytometry using two simultaneous surface markers: CD4 and CD8. The results obtained in this study indicate that malnutrition is associated with a significant increase in double negative subset (CD4-CD8-) and with a significant decrease in double positive subpopulation (CD4+ CD8+). Nevertheless, the percentages of single positive thymocytes CD4+ and CD8+ were similar in both groups of animals.

Presentación

Luis Fernando Plenge Tellechea*

Cuando el Consejo Editorial de Revistas de nuestra Institución me invitó a participar como coordinador de este volumen de la reciente creada revista *Ciencia en la Frontera*, fue para mí un motivo de orgullo.

Por mi formación como joven investigador en el área de las Ciencias Biomédicas, decidimos que este volumen fuera encaminado hacia el área de la Biología Experimental y Biomedicina. No sólo nos dimos a la tarea de recabar artículos de revisión sobre temas diversos, sino que para elevar aún más la calidad de esta revista, decidimos agregar artículos científicos de carácter experimental directo en el laboratorio. Con esto no sólo conseguimos nuestros objetivos, sino que los ampliamos incluyendo artículos provenientes del extranjero y de distintas instituciones de reconocido prestigio nacional, lo cual, sin duda viene a enriquecernos con diversas formas y métodos de trabajar en un laboratorio científico.

Quizás podemos hacernos la siguiente pregunta: ¿por qué tanta insistencia en ir más allá pudiendo generar nuestros propios artículos? La respuesta a mi juicio y con base en mi experiencia en el ramo, es que interactuando con nuestro

entorno podremos conseguir una mayor calidad en el aprendizaje científico y cultural.

Es bien conocido que hasta las distintas células de los tan variados tejidos que nos conforman interactúan entre sí para llegar a realizar un bien común dentro de las distintas actividades de la célula. Por ejemplo, nuestra sangre transporta los distintos elementos nutritivos que necesitamos para vivir, sin embargo, el hígado los transforma para nuestro lenguaje metabólico y para que puedan ser utilizados por los diversos tejidos, la sangre los retoma y los riñones sanean la sangre de los desechos que se produjeron en el metabolismo de los nutrientes. Con la ciencia sucede lo mismo, es necesario que miremos hacia afuera e interactuemos con los científicos del exterior de nuestra Universidad, intercambiando ideas y opiniones que enriquezcan sin duda, nuestra forma de pensar y de trabajar. México me brindó por medio del CONACYT la oportunidad de cursar mis estudios de posgrado en el extranjero y allí es donde comprobé la necesidad que tenemos de enriquecernos de la forma de pensar en otras latitudes y generar investigación de buen nivel y de cómo también los científ-

* Profesor-investigador del Centro de Investigación del Instituto de Ciencias Biomédicas, UACJ. Correl: fplenge@uacj.mx.

cos del exterior requerirán del conocimiento a partir de la ciencia que generamos en nuestra Institución, que sin duda también tenemos mucho que ofrecerles.

Durante visitas a distintos centros de investigación científica de nuestro país, comprobé que la ciencia biomédica que se genera es de muy alto nivel comparado con países que se distinguen en ello. Sin embargo, dichos centros aún son escasos y la mayoría están en el centro en la república. Por ello me siento muy orgulloso de que esta Institución se esté encaminando a dar este paso decisivo por medio de la divulgación de la ciencia en la frontera, es decir, en la frontera científica y cultural de países vecinos disímbolos pero con necesidades de investigación semejantes.

Es en la frontera norte donde vivimos más frecuentemente este movimiento cultural. Dice un gran proverbio “Conociendo nuestro alrededor, nos conoceremos a nosotros mismos”, es la ciencia precisamente la que nos va acercando a formar una cultura única en donde haya comunicación sin importar el idioma, la cultura y origen de cada país. Es bien conocido que la lengua oficial de divulgación científica es el idioma inglés, pero ello en el fondo encierra un acercamiento, que es el contenido de lo que pretendemos divulgar. Por ello, en este volumen incluimos artículos tanto en inglés como en español, además, en todos hay un resumen escrito en ambos idiomas, con ello pretendemos dar facilidad tanto al hispanoparlante como al que no lo es.

De este modo hacemos posible la internacionalización de nuestra revista de ciencias, es decir, nos acercamos más a los lectores.

Por último, quisiera enfatizar que es precisamente la juventud de hoy la que heredará nuestros conocimientos, ellos tendrán que ser motivados en nuestro tiempo presente para que el día de mañana puedan realizar este tipo de ciencia mediante el buen ejemplo que hoy les demos con nuestro esfuerzo y dedicación a la investigación científica.

Quisiera comentar que la ciencia es única, a ella se le suele definir en estos dos términos: básica y aplicada. Pienso que el fin de la investigación es llegar a descubrir cada vez más lo que somos y los que nos rodea, ello motivado por la curiosidad y la creatividad, sin ellas avanzaremos muy poco o nada, no me explico por tanto, cómo la ciencia aplicada no sea básica y la básica sin aplicar, ambas van de la mano, ya que buscan descubrir y solucionar un bien común.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez a la cual estoy orgulloso de pertenecer, el haberme proporcionado la oportunidad de coordinar este volumen encaminado precisamente a la Biología Experimental y Biomedicina, que sin duda alguna nos enriquecerá a los que laboramos en ella y a todos en particular poniendo nuestro granito de arena con el fin de construir un mundo mejor, donde exista la verdadera paz y la armonía a través del conocimiento científico. Muchas gracias a todos.



ALTERACIÓN DE LA SEÑAL DE Calcio en músculo cardiaco

Fernando Soler¹ y Francisco Fernández-Belda²

En este trabajo se describen los mecanismos y moléculas implicadas en el control del Ca^{2+} libre en el citoplasma, que es la señal reguladora de la contracción del músculo cardiaco. Alteraciones en ese control dan lugar a diferentes respuestas celulares que conducen a un descenso en la capacidad contráctil de las células así como al número de éstas. El conocimiento de los mecanismos de regulación del Ca^{2+} y la aplicación de tratamientos basados en técnicas de manipulación genética y en el uso de nuevos inhibidores, abren la posibilidad a una futura actuación terapéutica con objeto de corregir las consecuencias de esa alteración.

LA SEÑAL DE Ca^{2+}

La salida de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} es la base del mecanismo de excitación-contracción que opera en el músculo cardiaco (Fabiato, 1985). El proceso consiste en que canales de Ca^{2+} que hay en la región de túbulos T de la membrana plasmática se activan durante el potencial de acción para permitir la entrada al citoplasma de una pequeña cantidad de Ca^{2+} extracelular. Esto activa al receptor de rianodina o canal intracelular de Ca^{2+} que se abre y da lugar a la salida al citoplasma de Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico.

La salida de Ca^{2+} desde el depósito intracelular hace que la concentración en el citoplasma que es de $0.1 \mu\text{M}$ se eleve hasta aproximadamente $1 \mu\text{M}$. Esa elevación del Ca^{2+} es momentánea y sirve como señal para activar la contracción muscular. La relajación diastólica se produce cuando la concentración de Ca^{2+} vuelve al nivel basal. En este proceso interviene fundamentalmente la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana del retículo sarcoplásmico (SERCA2a) y en menor extensión el intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática. La ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) se encarga de mantener el nivel basal de Ca^{2+} . La figura 1 muestra un esquema de los flujos de Ca^{2+} y las moléculas que controlan su transporte en un miocito de corazón.

La isoforma 2a de la proteína SERCA, que es específica del miocardio, juega un papel clave en el control del Ca^{2+} . Por una parte asegura una relajación adecuada de la fibra muscular al permitir que baje la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma y se restablezca el nivel basal. Al mismo tiempo rellena los depósitos de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, lo que resulta esen-

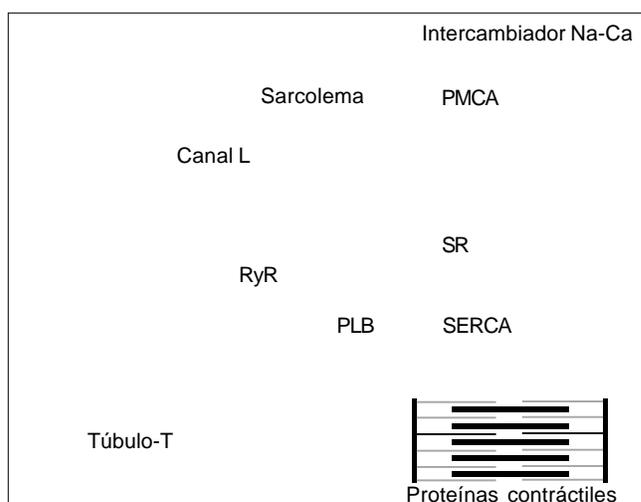


FIGURA 1. Representación esquemática de flujos y transportadores de Ca^{2+} implicados en la actividad contráctil de un miocito cardiaco. El potencial de acción abre canales de Ca^{2+} de tipo L en la región de los túbulos T del sarcolema (membrana plasmática). Entra una pequeña cantidad de Ca^{2+} al citoplasma que activa al receptor de rianodina (RyR) y se produce salida de Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico (SR). El Ca^{2+} liberado induce la contracción de las miofibrillas. El estado de relajación se produce por el bombeo de Ca^{2+} al interior del SR que realiza la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA) que hay en esa membrana. Cuando fosfolambano (PLB) está sin fosforilar interacciona con SERCA y hace que la capacidad catalítica del transportador sea baja. El intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática tiene un papel complementario. La ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) se encarga de mantener el nivel de Ca^{2+} cuando la célula está en reposo.

cial para que se produzca el siguiente ciclo de contracción.

La actividad de SERCA2a se regula a través de su interacción con fosfolambano (Koss y Kranias, 1996), un polipéptido

¹ Doctor en Ciencias y profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia, España. Correl: fsoler@fcu.um.es

² Doctor en Ciencias y catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia, España. Correl: fbelda@fcu.um.es

de la membrana del retículo sarcoplásmico cardíaco cuya forma activa tiene estructura pentamérica (22 kDa). Cuando fosfolambano está sin fosforilar interacciona con SERCA2a y hace que disminuya la afinidad de unión de Ca^{2+} al transportador. Por tanto, fosfolambano ejerce un efecto inhibitorio de la actividad SERCA2a a bajas concentraciones de Ca^{2+} . La fosforilación de fosfolambano en su serina-16 hace que se disocie de SERCA2a y eso produce un aumento en la velocidad de entrada de Ca^{2+} al retículo. Es decir que la disociación de fosfolambano fosforilado desinhibe a SERCA2a y acelera la relajación. La fosforilación de fosfolambano está controlada por la ruta de activación adrenérgica (Koch *et al.*, 1995). Esto explica en parte que las catecolaminas aumenten la fuerza del latido cardíaco, es decir que produzcan un efecto inotrópico positivo.

El receptor adrenérgico b es una proteína que contiene siete hélices a atravesando la membrana plasmática. La unión del agonista que se produce en la cara extracelular del receptor activa a la proteína G_s que se localiza en la cara interna de la membrana. La subunidad a de G_s unida a GTP activa a otra proteína de membrana, adenilato ciclasa, que cataliza la formación de cAMP a partir de ATP. Por último interviene la quinasa A de proteínas que se activa en presencia de cAMP y lleva a cabo la fosforilación de fosfolambano (figura 2).

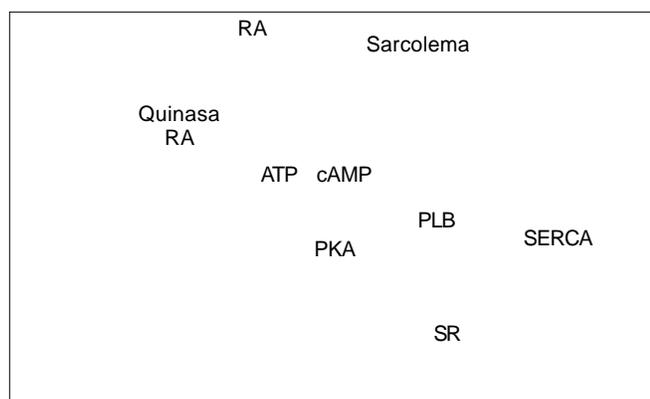


FIGURA 2. Mecanismo de activación de SERCA2a a través de la ruta adrenérgica. La interacción de catecolaminas con el receptor adrenérgico (RA) b de la membrana plasmática (sarcolema) activa a la proteína G_s que a través de su subunidad a activa a adenilato ciclasa (AC). Esta enzima de membrana cataliza la formación de AMP cíclico que a su vez activa a la quinasa A de proteínas (PKA). Esta quinasa fosforila a fosfolambano (PLB) a partir de ATP. La forma fosforilada de fosfolambano no interacciona con la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA) y eso aumenta la capacidad de transporte de Ca^{2+} al interior del retículo sarcoplásmico (SR). El fallo cardíaco da lugar a un descenso en la afinidad de unión de catecolaminas al receptor (insensibilización). Este efecto se debe a una sobreestimulación del receptor adrenérgico que induce su fosforilación por una quinasa (quinasa RA).

FALLO CARDIACO

El fallo cardíaco es un síndrome clínico complejo que surge de una combinación de factores de tipo genético, fisiológico y ambiental y que aparece en el curso de la evolución de algunas cardiomiopatías. Tiene un carácter gradual ya que los síntomas se van agravando con el tiempo y eso produce un dete-

riorio progresivo de la función cardíaca que puede desembocar en muerte súbita. La característica esencial desde el punto de vista funcional es un descenso drástico en la capacidad contráctil del miocardio que se debe a un descenso en las elevaciones de Ca^{2+} que actúan como señal para la contracción. En esta situación patológica se observa un menor nivel de expresión de algunos genes entre los que se encuentran los que codifican a SERCA2a y al receptor adrenérgico b. Otra observación relacionada con este estado es un descenso en el nivel de acumulación del intermedio fosforilado de SERCA2a, lo que implica un descenso en la capacidad para transportar Ca^{2+} al interior del retículo sarcoplásmico.

La dificultad del Ca^{2+} para inducir un ciclo óptimo de contracción-relajación pone en marcha un mecanismo de compensación en el que participan las catecolaminas. Estas producen activación de la ruta adrenérgica, lo que da lugar a la fosforilación de fosfolambano y a la activación de SERCA2a. En realidad lo que se produce es una sobreestimulación del receptor adrenérgico b y eso origina la activación de una quinasa que fosforila al receptor adrenérgico b. Esta respuesta celular hace disminuir la afinidad de unión del agonista (catecolaminas) al receptor en un proceso que se denomina insensibilización. La respuesta celular también incluye un descenso en el número de receptores adrenérgicos b y la aparición de desacoplamiento en los receptores que quedan (Rockman *et al.*, 1998).

APOPTOSIS

La pérdida de miocitos a través de apoptosis o muerte celular programada es un fenómeno que se observa en el curso de distintos tipos de cardiopatías entre los que se incluye el fallo cardíaco (MacLellan y Schneider, 1997). Este proceso está relacionado con situaciones de estrés celular tal como lo demuestra el hecho de que la activación de la proteína p38, que es un tipo de quinasa de proteínas MAP (quinasas que se activan por mitógenos), conduce a la apoptosis de cardiomiocitos (Wang *et al.*, 1998). A este respecto cabe señalar que la apoptosis parece ser un balance dinámico entre rutas catalizadas por distintas quinasa de proteínas MAP. Las rutas en las que intervienen p38 y JNK (quinasa del extremo NH_2 de jun), que se activan por estrés celular e inducen apoptosis y la ruta en la que interviene ERK (quinasa que responde a señal extracelular) que se activa por factores de crecimiento y tiene efecto inhibitorio de la apoptosis (Xia *et al.*, 1995).

La apoptosis es una respuesta celular compleja y en ella puede actuar el Ca^{2+} como inductor, tal como se observa en distintos tipos de células y tejidos. El papel del Ca^{2+} como activador de la apoptosis se puso de manifiesto por primera vez al tratar timocitos inmaduros con glucocorticoides (Kaiser y Edelman, 1977). La presencia de glucocorticoides induce una elevación de Ca^{2+} en el citoplasma y eso da lugar a una activación de endonucleasas celulares y a la fragmentación del material genético. En este caso,

la apoptosis se puede inducir en ausencia de glucocorticoides añadiendo un ionóforo específico para Ca^{2+} . Sin embargo, este efecto del Ca^{2+} no se observa en todo tipo de células. Hay casos en los que la elevación de Ca^{2+} produce el efecto contrario. Esto es lo que ocurre en células hematopoyéticas madre que sufren apoptosis cuando se elimina interleuquina-3 del medio de cultivo. La adición del ionóforo A23187 produce un bloqueo de la apoptosis debido a que origina una elevación de Ca^{2+} que estimula la producción de interleuquina-4. Las células no muestran actividad endonucleasa activada por Ca^{2+} en estas condiciones.

El uso de inhibidores de la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA) es otra herramienta experimental utilizada para estudiar procesos que son dependientes del Ca^{2+} libre en el citoplasma. Estos compuestos vacían los depósitos intracelulares y activan la entrada de Ca^{2+} extracelular. Así, la adición de tapsigargina a timocitos de rata (Jiang *et al.*, 1994), o a células tumorales humanas de próstata (Furuya *et al.*, 1994) o hígado (Kaneko y Tsukamoto, 1994) induce la fragmentación del material genético y la activación de mecanismos característicos de la apoptosis. Otro inhibidor como es el ácido ciclopiazónico también induce apoptosis en células secretoras de insulina (Zhou *et al.*, 1998) o en células S49 (Bian *et al.*, 1997). El inhibidor tapsigargina también produce activación en fibroblastos de ratón de la expresión de c-fos y c-jun que son componentes del factor de transcripción AP-1 (Schöntal *et al.* 1991). En relación con esto, se ha visto que la transcripción de c-jun está controlada por la ruta de la JNK en la que participan en cascada una serie de quinasas de proteínas (Kyriakis *et al.*, 1994). Es importante señalar que esta ruta se activa en situaciones de estrés celular y para ello se requiere la presencia de Ca^{2+} (Knight y Buxton, 1996).

El efecto de tapsigargina al igual que el de un ionóforo de Ca^{2+} no siempre es el de inductor de apoptosis. Así por ejemplo tapsigargina induce apoptosis en neuronas inmaduras de cerebelo pero no en neuronas maduras (Levick *et al.*, 1995).

Un trabajo reciente (Lotem *et al.*, 1999) muestra que compuestos que movilizan Ca^{2+} , tales como A23187 o tapsigargina, pueden inducir o bloquear la apoptosis en un mismo tipo de célula. Estos agentes inducen apoptosis si las células no sobreexpresan la proteína p53 y sin embargo bloquean la apoptosis si las células sobreexpresan p53. Ambas respuestas dependen de una elevación de Ca^{2+} que activa a una fosfatasa de proteínas, calcineurina, por eso si se añade ciclosporina A que es un inhibidor de calcineurina se suprimen los efectos. También se muestra que la inducción de la apoptosis está relacionada con la activación de la ruta en la que interviene p38, una quinasa de proteínas MAP.

Todas estas observaciones revelan la complejidad de los mecanismos de degradación celular. En este sentido no se conoce con detalle el papel del Ca^{2+} como efector de apoptosis. El efecto que induce una elevación prolongada de Ca^{2+} en el citoplasma parece depender del tipo de activación genética que produzca y eso varía con cada tipo de célula o tejido.

ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN

El conocimiento de los mecanismos de control del Ca^{2+} en el músculo cardiaco ha permitido diseñar una serie de estrategias que pueden llegar a ser de utilidad como tratamiento terapéutico. Algunos de los procedimientos experimentales más recientes se basan en técnicas de ingeniería genética. Así por ejemplo, utilizando ratones transgénicos en los que se incorpora el transgen SERCA2a se puede conseguir una sobreexpresión del transportador SERCA2a en cardiomiocitos. Esto se traduce en un aumento de la contracción y relajación del músculo cardiaco (He *et al.*, 1997). La transfección de adenovirus conteniendo el gen de parvalbúmina a cardiomiocitos ha sido otra de las estrategias. Parvalbúmina es una proteína con capacidad para unir Ca^{2+} que está presente en el músculo de peces. La afinidad de parvalbúmina para unir Ca^{2+} es mayor que la de SERCA2a pero menor que la de troponina C, por eso la incorporación del gen de parvalbúmina al músculo cardiaco y la consiguiente sobreexpresión de esta proteína, sirve de complemento a la acción transportadora de SERCA2a. Parvalbúmina ayuda a bajar el nivel de Ca^{2+} en el citoplasma que es esencial para conseguir una adecuada relajación muscular. De esta forma, la incorporación de parvalbúmina al miocardio mejora el ciclo de contracción-relajación (Wahr *et al.*, 1999).

La eliminación del gen de fosfolambano o la modificación de su secuencia mediante mutagénesis dirigida, han sido otras de las actuaciones a nivel molecular para conseguir una potenciación del ciclo de contracción-relajación cardiaco. En cualquiera de los dos casos lo que se consigue es eliminar la interacción de fosfolambano con SERCA2a y por tanto permitir que aumente la actividad del transportador (Minamisawa *et al.*, 1999).

La manipulación de la ruta de activación adrenérgica que fosforila a fosfolambano con objeto de aumentar la actividad de SERCA2a ha sido otro de los caminos que también ha proporcionado resultados satisfactorios. Así por ejemplo, la sobreexpresión del receptor adrenérgico β_2 en tejido cardiaco de ratones transgénicos permite alcanzar el mismo nivel de activación de la ruta adrenérgica en ausencia de catecolaminas, que cuando se estimula con isoproterenol a animales control que carecen del transgen (Milano *et al.*, 1994). Por otra parte, la sobreexpresión en músculo cardiaco de un péptido inhibidor de la quinasa del receptor adrenérgico β utilizando ratones transgénicos, evita la insensibilización del receptor que provoca la presencia de catecolaminas (Akhter *et al.*, 1999). Otra de las intervenciones ha consistido en aumentar la expresión de adenilato ciclasa en ratones transgénicos que presentan cardiomiopatía dilatada. Esta intervención también consigue contrarrestar la insensibilización del receptor adrenérgico β en respuesta a catecolaminas con lo que mejora la función cardiaca (Roth *et al.*, 1999).

A pesar de que todas estas manipulaciones moleculares per-

miten una mejora de la función cardíaca a corto plazo en animales de laboratorio, se desconoce si pueden llegar a tener una aplicación terapéutica en humanos. Hay que tener en cuenta que la potenciación a largo plazo de alguno de los procesos implicados en el control del Ca^{2+} puede dar lugar a la aparición de otras alteraciones tales como descompensación cardíaca o arritmias.

La apoptosis que es un proceso fisiológico a través del cual se controla el número de células de un órgano o tejido también puede ser objeto de intervención, en este caso farmacológica. La pérdida de tejido asociada a fallo cardíaco o en general a enfermedades degenerativas es una alteración relacionada con el control de la apoptosis. Dentro de las drogas antiapoptóticas disponibles podemos destacar a los inhibidores de quinasas de proteínas MAP que se activan por estrés celular (figura 3). Estas moléculas tienen una afinidad por la quinasa correspondiente que está en el rango nanomolar y muestran distinta estructura química así como especificidad de acción. Entre los inhibidores específicos de la quinasa p38 los hay con estructura de piridinilimidazol. Este es el caso de SB203580 (4-(4-fluorofenil)-2-[4-(metilsulfinil)fenil]-5-(4-piridinil)imidazol), SB202190 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxilfenil)-5-(4-piridinil)imidazol) ó L786134 (4-(4-trifluorometilfenil)-2-(4-piperidinil)-5-(4-piridinil)imidazol. Estos compuestos son inhibidores competitivos del ATP en el centro activo de la quinasa (Lisnock *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1999). Otros inhibidores de p38 como L167307 y L167782 tienen un anillo central de pirrol en lugar del anillo de imidazol. También se conoce un inhibidor semisintético con estructura de indolcarbazol denominado CEP1347 ó KT7515 que es específico de la quinasa JNK y cuyo mecanismo de inhibición se desconoce por el momento (Maroney *et al.*, 1998).

Otro de los niveles con posibilidad de intervención es el de las proteasas de cisteína o caspasas que están implicadas en la señalización y degradación celular. Los inhibidores más potentes que se conocen tienen estructura de oligopéptido con distintas secuencias que reconocen el centro activo de la enzima y por tanto muestran especificidad para las distintas caspasas (García-Calvo *et al.*, 1998). La inhibición se hace irreversible cuando se añade a la secuencia un grupo químico reactivo como fluorometilcetona, clorometilcetona o aminometilcumarina aunque esto aumenta su capacidad de reacción y disminuye la especificidad. Así por ejemplo, acetil-Trp-Glu-His-Asp-aldehído (Ac-WEHD-CHO) es un potente inhibidor reversible de caspasa-1 mientras que benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-fmk) es un inhibidor irreversible de caspasa-1 ó caspasa-2. El tetrapéptido acetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído (Ac-DEVD-CHO) se suele utilizar como inhibidor reversible de caspasa-3 aunque en realidad es inhibidor de la polimerasa de poliADP-ribosa que a su vez se activa por caspasa-3. Un inhibidor directo de caspasa-3 es acetil-Asp-Met-Gln-Asp-aldehído (Ac-DMQD-CHO) mientras que acetil-Leu-Glu-His-Asp-aldehído (Ac-LEHD-CHO) es inhibidor de caspasa-9.

La aplicación de terapia génica y la utilización de fármacos

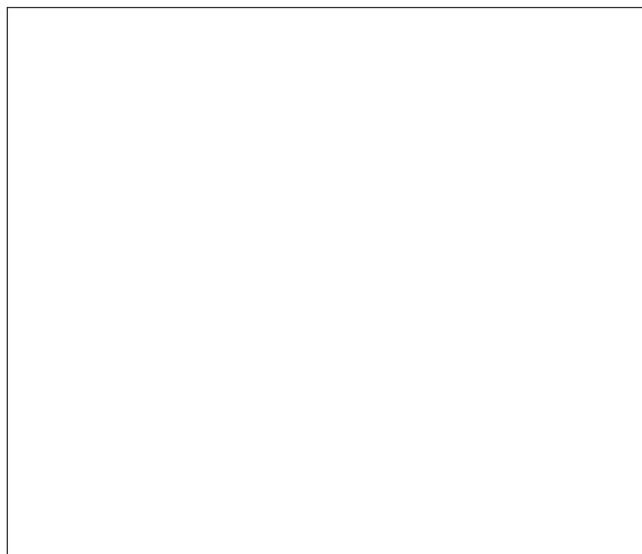


FIGURA 3. Inhibidores específicos de quinasas de proteínas MAP (quinasas que se activan por mitógenos) y que de forma indirecta bloquean la apoptosis. Debajo del nombre de cada inhibidor se anota entre paréntesis la quinasa que inhiben (p38 ó JNK).

antiapoptóticos constituyen nuevas herramientas que pueden revolucionar en los próximos años el tratamiento de diversas patologías. El conocimiento de los procesos patológicos a nivel molecular es la base para la aplicación de esos nuevos tratamientos terapéuticos.

REFERENCIAS

- Akhter, S. A., Eckhart, A. D., Rockman, H. A., Shotwell, K., Lefkowitz, R. J. y Koch W. J. "In vivo inhibition of elevated myocardial beta-adrenergic receptor kinase activity in hybrid transgenic mice restores normal beta-adrenergic signaling and function". *Circulation* 100, 1999. Pp. 648-653.
- Bian, X., Hughes, F. M. Jr., Huang, Y., Cidlowski, J. A. y Putney, J. W. Jr. "Roles of cytoplasmic Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells". *Am. J. Physiol.* 272, 1997. C1241-1249.
- Fabiato, A. "Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell". *J. Gen. Physiol.* 85, 1985. Pp. 247-289.
- Furuya, V., Lundmo, P., Short, A.D., Gill, D. L. e Isaacs, J. T. "The role of calcium, pH and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin". *Cancer Res.* 54, 1994. Pp. 6167-6175.
- García-Calvo, M., Peterson, E.P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W. y Thornberry, N. A. "Inhibition of human caspasas

- by peptide-based and macromolecular inhibitors". *J. Biol. Chem.* 273, 1998. Pp. 32608-32613.
- He, H., Giordano, F. J., Hilal-Dandan, R., Choi, D.-J., Rockman, H. A., McDonough, P. M., Bluhm, W. F., Meyer, M., Sayen, M. R., Swanson, E. y Dillmann, W. H. "Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation". *J. Clin. Invest.* 100, 1997. Pp. 380-389.
- Jiang, S., Chow, S. C., Nicotera, P. y Orrenius, S. "Intracellular Ca²⁺ signals activate apoptosis in thymocytes: Studies using the Ca²⁺-ATPase inhibitor thapsigargin". *Exp. Cell Res.* 212, 1994. Pp. 84-92.
- Kaiser, N. y Edelman, I. S. "Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1977. Pp. 638-642.
- Kaneko, Y. y Tsukamoto, A. "Thapsigargin-induced persistent intracellular calcium pool depletion and apoptosis in human hepatoma cells". *Cancer Lett.* 79, 1994. Pp. 147-155.
- Knight, R. J. y Buxton, D. B. "Stimulation of c-jun kinase and mitogen-activated protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat heart". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 1996. Pp. 83-88 (1996).
- Koch, W. J., Rockman, H. A., Samama, P., Hamilton, R. A., Bond, R. A., Milano, C. A. y Lefkowitz, R. J. "Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor". *Science* 268, 1995. Pp. 1350-1353.
- Koss, K. L. y Kranias, E. G. "Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility". *Cir. Res.* 79, 1996. Pp. 1059-1063.
- Kumar, S., Jiang, M. S., Adams, J. L. y Lee, J. C. "Pyridinylimidazole compound SB203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 1999. Pp. 825-831.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F. Avruch, J. y Woodgett, J. R. "The stress-activated protein kinase subfamily of c-jun kinases". *Nature* 369, 1994. Pp. 156-160.
- Levick, V., Coffey, H. y D'Mello S. R. "Opposing effects of thapsigargin on the survival of developing cerebellar granule neurons in culture". *Brain Res.* 676, 1995. Pp. 325-335.
- Lisnock, J. M., Tebben, A., Frantz, B., O'Neill, E. A., Croft, G., O'Keefe, S. J., Li, B., Hacker, C., Laszlo, S., Smith, A., Libby, B., Liverton, N., Hermes, J. y LoGrasso, P. "Molecular basis for p38 protein kinase inhibitor specificity". *Biochemistry* 37, 1998. Pp. 16573-16581.
- Lotem, J., Kama, R. y Sachs, L. "Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activated calcineurin". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1999. Pp. 12016-12020.
- MacLellan, W.R. y Schneider, M. D. "Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease". *Circ. Res.* 81, 1997. Pp. 137-144.
- Maroney, A. C., Glicksman, M. A., Basma, A. N., Walton, K. M., Knight, E. J., Murphy, C. A., Bartlett, B. A., Finn, J. P., Angeles, T., Matsuda, Y., Neff, N. T. y Dionne, C. A. "Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway". *J. Neurosci.* 18, 1998. Pp. 104-111.
- Milano, C. A., Allen, L. F., Rockman, H. A., Dolber, P. C., McMinn, T. R., Chien, K. R., Johnson, T. D. Bond, R. A. y Lefkowitz, R. J. "Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor". *Science* 264, 1994. Pp. 582-586.
- Minamisawa, S., Hoshijima, M., Chu, G., Ward, C.A., Frank, K., Gu, F., Martone, M. E., Wang, Y., Ross, J. Jr., Kranias, E. G., Giles, W. R. y Chien, K. R. "Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy". *Cell* 99, 1999. Pp. 312-322.
- Rockman, H. A., Chien, K. R., Choi, D. J., Iaccarino, G., Hunter, J. J., Ross, J. Jr., Lefkowitz, R. J. y Koch, W. J. "Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1998. Pp. 7000-7005.
- Roth, D. M., Gao, M.H., Lai, N. C., Drumm, J., Dalton, N., Zhou, J. Y., Entrikin, D. y Hammond, H. K. "Cardiac-directed adenylyl cyclase expression improves heart function in murine cardiomyopathy". *Circulation* 99, 1999. Pp. 3099-3102.
- Schöntal, A., Sugarman, J., Brown, J. H., Hanley, M. R. y Feramisco, J. R. "Regulation of c-fos and c-jun protooncogene expression by the Ca²⁺-ATPase inhibitor thapsigargin". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1991. Pp. 7096-7100.
- Wahr, P. A., Michele, D. E. y Metzger, J. M. "Parvalbumin gene transfer corrects diastolic dysfunction in diseased cardiac myocytes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1999. Pp. 11982-11985.

- Wang Y., Huang, S., Sah, V. P., Ross, J. Jr., Brown, J. H. Han, J. y Chien, K. R. "Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family". *J. Biol. Chem.* 273, 1998. Pp. 2161-2168.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. y Greenberg, M. E. "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis". *Science* 270, 1995. Pp. 1326-1331.
- Zhou, Y. P., Teng, D., Dralyuk, F., Ostrega, D., Roe, M. W., Philipson, L. y Polonsky K. S. "Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca^{2+} stores and arachidonic acid metabolism". *J. Clin. Invest.* 101, 1998. Pp. 1623-1632.

HIPERTERMIA MALIGNA, UN SÍNDROME OCASIONADO POR DISTURBIOS EN LA HOMEOSTASIS Celular del Ca^{2+} en músculo esquelético

Luis Fernando Plenge Tellechea y Joaquín Rodrigo García¹, Javier Vargas Medrano²

La hipertermia maligna (HM) es una enfermedad relacionada con un mal funcionamiento del canal de Ca^{2+} conocido como receptor de rianodina, (RyR1). El RyR es un canal de Ca^{2+} localizado en las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico de células musculares. Durante un funcionamiento regular del RyR se produce la apertura del canal mediante una señal a través de la membrana plasmática que da lugar a la salida de Ca^{2+} de los compartimientos del retículo sarcoplásmico y como resultado de ello se produce el fenómeno de la contracción muscular. Un mal funcionamiento en el RyR llevará como consecuencia disturbios en la homeostasis celular del Ca^{2+} en el músculo. Concretamente, durante una crisis de HM se produce una salida masiva de Ca^{2+} que conllevará a una sostenida contracción del músculo esquelético y por tanto, a un desorden metabólico, entre los cuales se destacan la acidemia muscular, elevación de la temperatura, taquicardia, entre otros, pudiendo ocasionar la muerte. Se ha demostrado que los individuos que padecen este mal (tanto el hombre como ciertos animales) son genéticamente susceptibles. Estas personas susceptibles a la HM pueden desarrollar una crisis al inhalar anestésicos de tipo volátiles como el halotano y otros compuestos relacionados. También se ha demostrado que las personas susceptibles pueden desencadenar una crisis de HM por motivos de estrés. Los estudios del RyR a nivel molecular confirman la presencia de una mutación puntual en la secuencia cADN que codifica para el RyR, la cual resulta en la sustitución de una Cys por la Arg en la posición 615 de dicha secuencia.

También se ha demostrado que el relajante muscular despolarizante dantrolene sódico, es una droga muy eficaz para el tratamiento de una crisis de hipertermia maligna. Esa droga administrada a tiempo evita la salida masiva de Ca^{2+} durante una crisis de HM, estableciéndose de esta forma los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma y posteriormente la salud del individuo.

INTRODUCCIÓN

La hipertermia maligna (HM), como su nombre lo indica, es una enfermedad poco común pero muy peligrosa que puede ocasionar la muerte del hombre y de algunas especies animales. Se le conoce clínicamente como una miopatía hipermetabólica similar al estado de choque. Es desencadenada en individuos genéticamente susceptibles tanto por motivos de estrés y por la inhalación de anestésicos o de relajantes musculares despolarizantes (Fraser *et al.*, 1988).

La hipertermia maligna ha sido reconocida desde la década de 1960 como una reacción metabólica inusual a ciertos agentes anestésicos que ocasionan frecuentemente desórdenes del músculo esquelético de tipo hereditarios (Mickelson y Louis, 1996). Los aspectos clínicos más frecuentes de la HM han sido objeto de un gran número de libros y revisiones desde las primeras descripciones de este síndrome y no se

proponen evaluar discusiones extensas o sólo los más importantes temas clínicos. El panorama general unificante de la HM que ha sido desarrollado en los últimos 30 años es la presencia de una anomalía fundamental en la capacidad del músculo susceptible a la hipertermia maligna (SHM) para regular adecuadamente su concentración de Ca^{2+} mioplásmica. Debido a que la concentración de Ca^{2+} mioplásmico controla la contracción muscular y la actividad metabólica, es evidente que una alteración sutil en el control del Ca^{2+} mioplásmico *in vivo* podría ocasionar significativas consecuencias fisiológicas.

La finalidad de esta revisión es recabar los aspectos identificados como alteraciones bioquímicas y fisiológicas de la hipertermia maligna por medio de estudios en los individuos y animales que presentan SHM que pudieran presentar una alteración en la regulación mioplásmica de Ca^{2+} . Para explicar las alteraciones en la regulación de Ca^{2+} muscular en tejidos

¹ Profesores e investigadores en el área biomédica de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ).

² Estudiante de Biología, UACJ.

VOCABULARIO CLAVE: Ca^{2+} -ATPasa: ATPasa dependiente de Ca^{2+} /DHPR: Receptor de dihidropiridina /HM: Hipertermia maligna /Min: Minutos /Ms: Milisegundos /RyR: Receptor de rianodina /RS: Retículo sarcoplásmico /SHM: Susceptibilidad a la hipertermia maligna.

SHM, es necesario hacerlo a un nivel molecular. Un enfoque común es el estudio de las alteraciones en la regulación del calcio mioplásmico de músculo esquelético SHM del cerdo, lo cual llevó a la identificación de una mutación en el gen del receptor de rianodina (RyR) de retículo sarcoplásmico (Mickelson y Louis, 1996). De la misma forma se discute la evidencia para anomalías asociadas con la regulación de Ca^{2+} en músculo SHM de humano, donde a pesar de que hay ciertamente muchas mutaciones RyR en muchas familias, también hay una significativa heterogeneidad génica (McIntosh *et al.*, 1977; MacLennan *et al.*, 1995). Aparentemente, se conoce menos sobre las bases de defectos en la regulación de Ca^{2+} mioplásmico en SHM de humano. Actualmente hay una discordancia entre los investigadores del SHM, es decir, que las alteraciones secundarias en la estructura y función muscular, resulta del defecto genético primario en el RyR u otros genes candidatos. También se ha revisado la interacción de la cafeína en tejidos SHM y músculo normal, el cual ayuda a formar las bases para el examen *in vitro* para determinar la susceptibilidad a la HM (Ellis y Harriman, 1973; Kalow *et al.*, 1970).

En este trabajo también se incluye una breve revisión de los efectos de agentes anestésicos en el músculo esquelético, que discute las diferencias entre SHM y músculos normales que podrían resultar en la iniciación y mantenimiento de los episodios de HM en individuos susceptibles.

Los cerdos son los animales principalmente afectados, pero se han reportado casos en caballos, perros, gatos, ciervos, pollos, conejos, ganado bovino (síndrome de músculo doble) y en el hombre (Fraser *et al.*, 1988). De ahí que se conozca que en el cerdo la susceptibilidad a la hipertermia maligna (SHM) está más ligada a las concentraciones de calcio presentes en el músculo esquelético.

Como se mencionó anteriormente, la salida de Ca^{2+} intracelular se vuelve anormal y como consecuencia su nivel podría elevarse (Enzmann *et al.*, 1998). De esta forma los músculos SHM podrían presentar prolongados tiempos de relajación y bajas frecuencias de contracción, lo cual se podría incrementar debido a la inhibición de la actividad enzimática de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico.

INCIDENCIA HM

La HM se presenta en virtud de la exposición a agentes desencadenantes de un síndrome de naturaleza genética, su incidencia varía en las diferentes poblaciones estudiadas. En general la incidencia es de entre cada 1/50,000 de las anestésias suministradas. También se ha observado que generalmente la HM se presenta en individuos de raza blanca y amarilla. La susceptibilidad ocurre igualmente en ambos sexos. Por otra parte, las crisis son más comunes en individuos adultos que en niños (1/1000 anestésias), y son raras en ancianos (Gomes do Amaral, 2000).

CUADRO CLÍNICO

Los ataques de la HM pueden ser caracterizados como fulminantes, sobreviviendo en cualquier momento durante la anestesia y hasta tres horas después de la interrupción de la exposición del agente desencadenante. Este cuadro, o hipermetabolismo se expresa en forma de rigidez muscular, aumento del consumo de oxígeno (O_2), la acumulación de CO_2 produce en consecuencia acidemia respiratoria y metabólica, taquicardia, entre otros síntomas. No en todos los casos la fiebre es una manifestación inicial o predominante en la HM. (Gomes do Amara, 2000).

Una reacción causada por un anestésico no común se ha estimado que ocurre de aproximadamente 1 caso por cada 12,000 pacientes, mientras que en uno de uso común se da 1 caso por cada 40,000 (Britt y Kalow, 1970; Kalow, Britt y Chan, 1979; Ording, 1985). Por ello se piensa que el verdadero número de individuos susceptibles podría ser considerable, ya que muchos pacientes han pasado anteriormente por severos momentos un episodio clínico de anestesia (Britt y Kalow, 1970; Gronert, 1994; Ording, 1985). Un síndrome idéntico fue identificado en cerdos alrededor del año 1966 (Hall *et al.*, 1966; Harrison *et al.*, 1968), desde entonces, los cerdos han servido de modelo para estudiar las bases moleculares de la HM.

Durante un episodio de HM se presenta una rápida y sostenida elevación de la temperatura corporal (tanto como $1^\circ\text{C}/5$ min en humanos susceptibles) que podrían exceder los 43°C (Gronert, 1994), así como un extraordinario incremento en el metabolismo aeróbico y anaeróbico, taquicardia, elevación de la concentración arterial de CO_2 , ácido láctico y la contracción de los músculos esqueléticos, acompañado de trastorno muscular (Gronert *et al.*, 1986). El paciente podría fallecer si no se inicia inmediatamente una terapia. Recientemente se ha desarrollado una técnica de escala clínica gradual que permite a los clínicos predecir con una mayor realidad, si una respuesta inusual a la anestesia no ha estado relacionada con un caso de HM (Larach *et al.*, 1994). De los anestésicos utilizados cuya aplicación induce a la HM, son los más volátiles como el halotano, enflurano, isoflurano, desflurano y el sevoflurano (Gronert *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 1968).

También se ha propuesto que la despolarización del músculo se produce por agentes relajantes como la succinilcolina que desencadenan los efectos de la HM por la vía neuronal y placa motora, mientras que los anestésicos volátiles actúan sobre canales de iones o bombas de iones (ambos de membrana) que participan directamente en el complejo de excitación y contracción del músculo esquelético (Mickelson y Louis, 1996).

Hay reportes de que el estrés físico o emocional, la ansiedad o cambios súbitos de la temperatura ambiental, también pueden iniciar un proceso de HM en algunos pacientes susceptibles (Gronert *et al.*, 1980).

Una crisis de HM se debe principalmente a una elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular. De este equilibrio iónico depende una gran cadena de eventos iniciada por el fenómeno de la contracción muscular rígida, hiperactividad metabólica (producto del calor, gran consumo de oxígeno $-\text{O}_2-$, anaerobiosis y acidemia láctica), hipercarbia, lisis celular (por introducción de sustancias intracelulares como K, Ca, creatinocinasa y mioglobina), activación de procoagulantes, etcétera.

De acuerdo a la información mencionada anteriormente, hay claras evidencias de que la falla causante de la HM se encuentra en el músculo esquelético. Se ha propuesto que la reacción de activación de la HM causada por un agente desencadenante resulta como consecuencia de un incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma de músculo esquelético (sarcoplasma). La rigidez muscular es casi patognomónica para la HM y la hipertermia al parecer depende de la contracción del músculo (Gronert *et al.*, 1980). Estas respuestas pueden ser explicadas por una activación dependiente de Ca^{2+} de ambos metabolismos: aeróbico y anaeróbico, resultando en consecuencia una acidosis respiratoria y metabólica. Se ha confirmado que se produce un aumento en la concentración de Ca^{2+} sarcoplasmático en el tejido SHM durante una exposición a halotano, utilizando tanto un electrodo de Ca^{2+} como la tinción fluorescente de Ca^{2+} (Iaizzo *et al.*, 1988; Lopez *et al.*, 1988), Gronert *et al.* (1986) demostraron eficazmente que el defecto causante de la HM reside en el músculo esquelético, desarrollando una preparación aislada de las extremidades posteriores de cerdo. Estas preparaciones de musculatura aislada reaccionaron a los agentes desencadenantes de HM de manera similar a como lo hubieran hecho directamente en cerdos, por lo tanto, el músculo SHM tiene una respuesta anormal a los agentes desencadenantes de HM, indicando que este tejido es el principal foco etiológico para la hipertermia maligna. Ciertos estudios realizados con dantrolene sódico, un relajante muscular despolarizante, revelaron que el músculo esquelético es el principal tejido afectado y es donde se presentan los episodios típicos de HM (Britt, 1987), además, las bajas concentraciones sarcoplásmicas de Ca^{2+} en músculo (Gronert *et al.*, 1986). Este agente se considera generalmente como relajante del músculo esquelético debido a que inhibe el proceso de la salida de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico, aunque el mecanismo preciso de acción todavía no se conoce con precisión. La determinación del sitio de acción y del mecanismo de acción de dantrolene podría contribuir para una mejor comprensión de la regulación de la salida de Ca^{2+} intracelular del músculo esquelético y estudiar con más detalle una posible solución al problema de la HM. Hay datos recientes que indican que el dantrolene se une con gran afinidad a la fracción de la membrana muscular en las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico (Parness y Palnitkar, 1995).

El diagnóstico de la HM no se fundamenta propiamente como un cuadro clínico (como radiografías, rayos X, etc.). Para una mayor utilidad de los exámenes complementarios, se debe hacer una evaluación de las complicaciones en respuesta al tratamiento. Una capnografía (registro cuantitativo del aire expirado por medio de un capnógrafo) tiene un gran valor como diagnóstico precoz de la HM, que avala la respuesta al tratamiento. De hecho, en casos fulminantes se observa la presencia de elevadas acentuaciones de CO_2 gaseoso no expirado (E/CO_2) en torrente sanguíneo venoso (PvCO_2) y arterial (PaCO_2) en comparación del CO_2 venoarterial regular. Sin embargo, pueden ser atenuadas por una hiperventilación en casos de crisis moderadas. También los procesos se destacan por un aumento de potasa, creatino-fosfoquinasa (CPK; de 12 a 24 horas después o al inicio de la crisis), creatinonemia, así como disturbios de la homeostasis celular. Fuera de crisis, una susceptibilidad a la HM se puede confirmar mediante un estudio realizado con una biopsia de tejido induciendo *in vitro* una posible respuesta con concentraciones crecientes de halotano y caféina (Gomes do Amaral, 2000).

Diagnóstico diferencial

Las manifestaciones clínicas de la HM no son específicas y podrían presentar los siguientes síntomas: como neurolépticos y litio (síndrome neuroléptico maligno) taquicardia, taquipnea, hipercarbia, acidosis respiratoria, rigidez muscular generalizada, arritmias, hiperpotasemia, elevación de la temperatura, inestabilidad hemodinámica y alteraciones relacionadas con la coagulación, las cuales podrían confundirse con diversas situaciones clínicas. Diversas drogas pueden desencadenar manifestaciones semejantes a las de la HM tales como: (Síndrome Maligno Neuroléptico), inhibidores de monoaminoxidasa, anfetamina, cocaína, antidepresivos tricíclicos, antipina, glicopirrolato, metoclopramida, cetamina, etc. (Gomes do Amaral, 2000).

Prueba del halotano en cerdos

El halotano (2-Bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano) es un anestésico aplicado por inhalación, no inflamable, ni explosivo, potente, ampliamente utilizado, caracterizado por un inicio de acción y reversión rápida. Los efectos colaterales incluyen disminución respiratoria y cardiovascular, así como sensibilidad a las arritmias inducidas por adrenalina (Stedman *et al.*, 1993).

La prueba del desarrollo de la contracción muscular de la HM humana puede inclusive ser usada para diagnosticar la HM en cerdos. Este reconocido ensayo nos sirve para validar el examen en pacientes humanos. Esta prueba se considera como un ensayo positivo debido a que en el cerdo puede validarse subsiguiente a la estimulación con anestesia *in vivo* conocida como "prueba de estimulación por halotano". Durante esta prueba los animales inhalan 3% de halotano a tra-

vés de una mascarilla. Esta prueba es típica en animales SHM, los cuales comúnmente exhiben un músculo rígido a los 5 minutos, mostrando taquicardia, cianosis e incrementos en la temperatura corporal (caso del cerdo) de 0.5-1.5 °C durante 10 a 20 minutos, alcanzando un aumento hasta los 43-45°C antes de la muerte (Allen *et al.*, 1990; Gronert, 1980; Gronert, 1986, Gronert, 1994). Los animales normales no muestran rigidez muscular o una temperatura elevada cuando son sujetos a una exposición de anestesia, de igual forma cuando se acompaña con succinilcolina, la cual induce dramáticamente el desencadenamiento de las contracciones en un músculo SHM (Mickelson y Louis, 1996).

La fuerza de la contracción del músculo esquelético se da en función de la liberación de Ca^{2+} en el mioplasma, lo cual demuestra que el aumento en la contractilidad del músculo SHM se da en respuesta al halotano y a la cafeína (estimulante cardíaco y neurológico). El halotano provoca la elevación de los niveles de Ca^{2+} mioplásmico con un efecto directo en la membrana celular del músculo (sarcolema), mientras que la succinilcolina causa de esta forma fasciculaciones en el músculo (Galloway *et al.*, 1986). Al incrementar la contractilidad *in vitro* por medio de halotano y cafeína, nos provee de una prueba específica para identificar la susceptibilidad a la HM (Kalow *et al.*, 1970; Ellis *et al.*, 1971).

Si una biopsia de muslo se expone a halotano *in vitro* y por separado se expone a distintas concentraciones crecientes de cafeína, las contracciones del músculo se podrían incrementar en pacientes que son susceptibles a HM. Hoy en día esta nueva prueba se está usando para identificar la susceptibilidad a la HM; los cuales presentan una reacción al inhalar anestésicos halogenados y/o suxametonio que están identificados como posibles agentes desencadenantes de la HM.

Discrepancia de las pruebas

Una prueba positiva de contracción *in vitro* es un excelente patrón para diagnosticar la susceptibilidad a la HM. En la actualidad, se han venido usando dos diferentes protocolos. En los laboratorios europeos se emplea el protocolo propuesto por Ellis y Leeds (Grupo Europeo Hiperpirexia Maligna, 1984) donde utilizan pruebas que consisten en incrementos de dosis adecuadas de halotano y de dosis de cafeína. En Estados Unidos y en el laboratorio de John Curtin y colaboradores, usan una dosis propia de halotano al 3% e incrementos sucesivos de dosis de cafeína. Los dos protocolos presentan los mismos resultados esenciales. Ocasionalmente existe una discrepancia entre las contracciones causadas por halotano y cafeína. Según Mickelson y Louis (1996) los europeos hacen alusión a tales resultados como “confusos”; los norteamericanos y su grupo los clasifican como “susceptibles”. Para evitarnos confusiones, ninguno de los casos ilustrados en el artículo de John Curtin presenta resultados “erróneos”, y las medidas tomadas en las contracciones producidas por halotano y con cafeína son incluidas por todos. Si alguno

adoptara este criterio, sería menor controversia sobre las posibles asociaciones entre la HM y otra enfermedad del músculo y una presentación clínica donde intervienen los anestésicos (Mickelson y Louis, 1996).

Uno de tantos trabajos nos explica cómo se llevan a cabo este tipo de procesos, como por ejemplo, la investigación realizada por Enzmann *et al.* (1998), quienes sometieron paquetes de células musculares de cerdo SHM intactas y de cerdos normales a un enfriamiento que produjo como consecuencia una baja frecuencia de estimulación. Como resultado de lo anterior, se observó una elevación de la contracción muscular y una prolongada relajación, siendo ésta más significativa en células SHM que en células de músculos normales (p. ej. 34 +/- 4% versus 16 +/- 4% de contracción, y 82.4 +/- 9.4 min versus 43.2 +/- 7.8 min del tiempo medio de relajación, tanto para músculos SHM como para músculos normales). Ello en comparación a la inhibición Ca^{2+} -ATPasa inducida por ácido ciclopiazónico. También indican que el enfriamiento durante una crisis de HM podría causar un aumento en la fuerza de las contracciones musculares. Este tipo de estudios y de muchos más viene a confirmar la afección directa sobre el receptor de rianodina (RyR) y por tanto, la bomba de calcio (Ca^{2+} -ATPasa) de células musculares.

De acuerdo a los datos expuestos anteriormente, es necesario explicar lo más esencial acerca de estas dos proteínas involucradas directamente en el proceso de la homeostasis celular de Ca^{2+} antes de discutir el proceso afectivo a nivel celular y molecular de la hipertermia maligna.

SEÑAL DE Ca^{2+}

El ion Ca^{2+} es una de las señales bioquímicas más importantes que intervienen en el control de la actividad celular (Tsien y Tsien, 1990; Berridge, 1993; Pozzan *et al.*, 1994). Su participación se ha podido demostrar en todo tipo de células desde las más sencillas, las procarióticas, hasta las eucarióticas más especializadas como las neuronas (Ghosh y Greendberg, 1995). Una característica habitual en la generación de señales bioquímicas es que la síntesis y degradación de las moléculas reguladas estén controladas por sistemas enzimáticos. Esto permite a la célula ajustar en cada momento los niveles de regulador que necesita. La concentración de Ca^{2+} no se puede regular de esa forma. El control de su concentración en el citoplasma exige un complejo dispositivo de moléculas que se encargan de su unión y transporte. La concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma cuando la célula está en reposo es de 100 nM, mientras que en el medio extracelular alcanza un valor próximo a 2 mM. Este importante gradiente de concentración permite que el Ca^{2+} pueda actuar como señal (Plenge-Tellechea, 1998; Fernández-Belda *et al.*, 1998).

Para que una molécula o ion actúe como señal intracelular es necesario que su concentración pueda variar al menos en un orden de magnitud y que tenga capacidad para unirse con

gran afinidad a moléculas diana (habitualmente proteínas). De todos los iones presentes en medios biológicos, el Ca^{2+} es el más adecuado para cumplir funciones de regulación dadas sus características de radio iónico y carga eléctrica. El ion Ca^{2+} se puede unir fuerte y selectivamente a proteínas debido a su capacidad de coordinación con átomos de oxígeno de glutamato, aspartato y asparragina (Kretsinger, 1980). Su unión a proteínas puede producir cambios con formaciones de gran magnitud que actúan como señales de regulación (Fernández-Belda *et al.*, 1998).

La concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma es en cada momento, el balance entre los flujos de entrada y salida de este ion (Carafoli, 1987). Los sistemas de transporte más importantes que controlan el nivel de Ca^{2+} en el citoplasma son los siguientes:

Canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática

La membrana plasmática dispone de canales que permiten la entrada selectiva de Ca^{2+} desde el medio externo (Clapham, 1995). Se clasifican en:

a) Canales sensibles a voltaje. Abundan de forma muy especial en células excitables (neuronas, células musculares y endocrinas) y se activan tras una despolarización de la membrana plasmática (McClesley, 1994) y son de apertura temporal ya que tienden a cerrarse espontáneamente. La entrada de Ca^{2+} a través de estos canales puede activar directamente la salida de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. Esto ocurre en algunas células excitables como en el músculo cardiaco y en neuronas, y su actividad puede estar regulada por algunos agonistas o reguladores intracelulares como el cAMP (Adenosín 5'-monofosfato cíclico).

b) Canales sensibles a ligandos. La apertura de estos canales se produce por la unión de un agonista extracelular que generalmente es un neurotransmisor. Estos canales son especialmente importantes en músculo liso y neuronas.

c) Canales activados por agotamiento por reservas intracelulares (store-operated channels), también conocidos como: CRAC (corriente de entrada de Ca^{2+} activada por la salida), o entrada capacitativa de Ca^{2+} . Están presentes en gran variedad de células y su activación está controlada por el nivel de Ca^{2+} almacenado en los depósitos intracelulares

del retículo endoplásmico o sarcoplásmico, según el tipo de célula (Putney y Bird, 1993; Clapham, 1995). Este mecanismo permite la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo al citoplasma y sirve para recargar los depósitos intracelulares (Plenge-Tellechea, 1998; Fernández-Belda *et al.*, 1998).

Canales intracelulares de Ca^{2+}

La salida de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares se realiza a través de dos tipos de canales que muestran similitudes estructurales y funcionales.

El receptor de rianodina, presente en la membrana del retículo endoplásmico/sarcoplásmico, que es especialmente abundante en células excitables y el receptor de IP_3 (inositol trifosfato) que se localiza mayoritariamente en la membrana de retículo endoplásmico y es típico de células no excitables (Berridge, 1993). Los receptores de rianodina son canales intracelulares liberadores de Ca^{2+} originalmente descritos en retículo sarcoplásmico (RS) del músculo esquelético (receptor tipo 1) o de músculo cardiaco (receptor tipo 2), y en el Retículo Endoplásmico Rugoso (RER) en células no musculares.

Se denominan receptores de rianodina desde que fueron primeramente aislados sobre la base de su habilidad de unir rianodina, un alcaloide de plantas. El canal Inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3)-liberador de Ca^{2+} , o receptores IP_3 , constituyen una

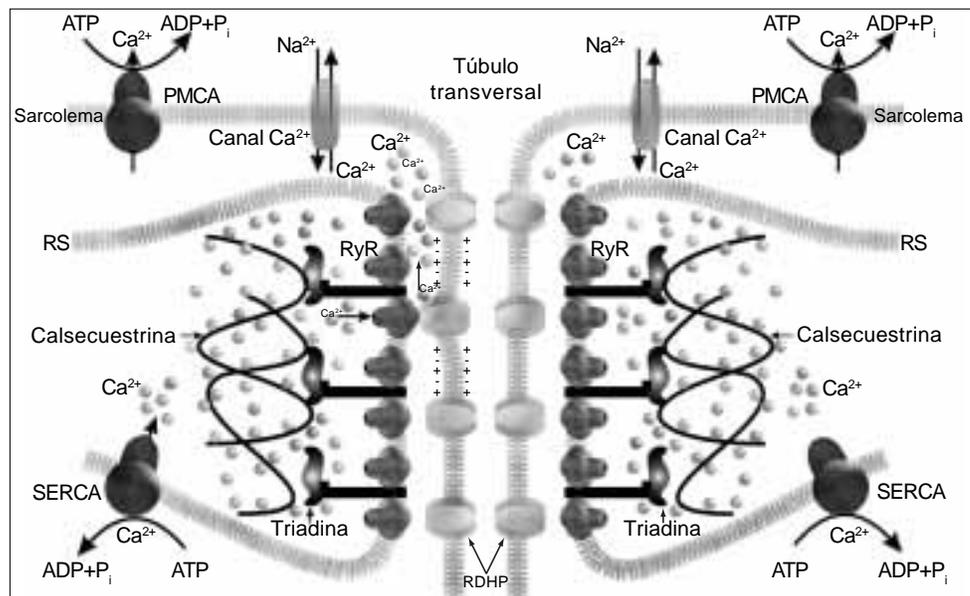


FIGURA 1. En esta figura se pueden apreciar claramente el complejo de proteínas que participan en el fenómeno de la **contracción muscular** (figura original tomada de Mickelson y Louis, 1996, modificada por Fernando Plenge y Javier Vargas).

segunda clase, separada de canales intracelulares de Ca^{2+} . Ambas clases son responsables de la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, y por consiguiente, del incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico observado durante la transducción siguiente a muy diferentes estímulos extracelulares, incluyendo hormonas y neurotransmisores (figura 1).

La salida de Ca^{2+} a través del receptor/canal de rianodina está controlada en vertebrados por el potencial de membrana de los túbulos T (Meissner, 1994; Schneider, 1994). Estudios farmacológicos han demostrado (Ríos y Brum, 1987) la existencia de una proteína denominada “receptor de dihidropiridina (DHPR) que se localiza en los túbulos T y que detecta cambios en el potencial de membrana durante el proceso de excitación-contracción. Esta proteína es un canal de Ca^{2+} sensible a voltaje (Campbell *et al.*, 1998; Caterrall, 1991). La activación del RyR en vertebrados responde también a factores endógenos. La activación por Ca^{2+} se le conoce como salida de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} siendo un mecanismo operativo al menos en músculo cardíaco (Fabiato, 1983).

Bombas de Ca^{2+} citoplásmico

Las células de vertebrados poseen dos tipos de bombas de Ca^{2+} , también llamadas ATPasas dependientes de Ca^{2+} , que pertenecen a lo que denominan bombas de tipo P (Pedersen y Carafoli, 1987) (figuras 1 y 2). Se caracterizan por formar un compuesto covalente enzima-fosfato durante su funcionamiento. Estas bombas de Ca^{2+} poseen similitudes estructurales y funcionales aunque están codificadas por dos familias distintas de genes y presentan diferente localización subcelular (Inesi y Kirtley, 1992). Estas son la ATPasa de membrana plasmática conocida como PMCA que según algunos estudios se sugiere su participación como moduladora de pequeñas concentraciones de Ca^{2+} citosólico. Esta se encarga de bombear iones de Ca^{2+} del nivel intracelular al medio extracelular. Existen distintas formas enzimáticas (PMCA1, PMCA2, PMCA3 y PMCA4), las cuales son codificadas por distintos genes según el tipo de tejido en que se encuentre, prácticamente se les encuentra en todo tipo de tejidos en

vertebrados. Para su estudio comúnmente se aísla en membranas de eritrocito libres de calmodulina y hemoglobina.

La otra bomba se conoce como ATPasa dependiente de Ca^{2+} de retículo endoplásmico o sarcoplásmico (SERCA). Se encarga de bombear Ca^{2+} desde el citoplasma al interior del retículo endoplásmico o sarcoplásmico. También están codificadas por genes distintos (tres) que presentan distinto grado de expresión dependiendo del tejido y del estado de desarrollo de organismo. Estas son SERCA1 que presenta dos isoformas: 1a (neonatal) y 1b (adulto) y es la más abundante en músculo esquelético de contracción rápida, el resto son SERCA2 a y b y SERCA3 (abunda en músculo liso y en tejidos no musculares como intestino, estómago, cerebro y páncreas (Brandl *et al.*, 1987; Burk *et al.*, 1989 –Tomado de Fernández-Belda *et al.*, 1998–).

GENÉTICA

Las irregularidades inherentes al músculo SHM, se sitúan en la regulación del Ca^{2+} mioplasmático. El RS es el primer almacén de Ca^{2+} en el músculo esquelético, y este Ca^{2+} es liberado por el complejo excitación-contracción (complejo E-C), la cual es controlada por al menos tres proteínas estructurales especializadas localizadas en el túbulo transversal (túbulo-T), en las membranas del retículo sarcoplásmico. La hipertermia maligna es desencadenada por una rápida y sostenida liberación de Ca^{2+} en el mioplasma.

La rianodina, es un alcaloide que se encuentra en las plantas que afecta la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Sutko *et al.*, 1985) se liga en la región del receptor de rianodina (RyR) responsable de la liberación de calcio (Zorzato *et al.*, 1990). Este receptor tiene una funcionalidad tanto estructural como de acoplamiento (McPherson y Campbell, 1993). Las mutaciones en el gen codificador del RyR se encuentran consideradas en primer plano como candidatos causantes de la HM. Una anomalía puntual (mutación de sólo un codón que codifica para un aminoácido en particular) en la secuencia del RyR del músculo esquelético de cerdo produce el fenómeno de la HM (Fujii *et al.*, 1991). Esta anomalía es debida concretamente a una mutación puntual en la secuencia del cADN que codifica para el RyR, la cual resulta en la sustitución de la Cys por la Arg en la posición 615. Ahora es posible establecer la diferencia real de un individuo portador a un individuo normal heterocigótico, y el genotipo de la HM porcina (Otsu *et al.*, 1992). En la HM humana, la genética es más complicada. Aunque en el linaje de la HM en los cromosomas análogos de algunas familias, se ha demostrado (MacLennan *et al.*, 1990) (McCarthy *et al.*, 1990) que este defecto está presente en menos del 5% de los pedigrís afectados por la HM, (Deufel *et al.*, 1992) y las mutaciones en el gen del RyR del músculo esquelético humano, cuentan para menos del 20% de los casos estudiados de la HM. (Quane *et al.*, 1994). Se ha demostrado inclusive una relación entre el RyR y la enfermedad central del corazón (Haan *et al.*, 1990).

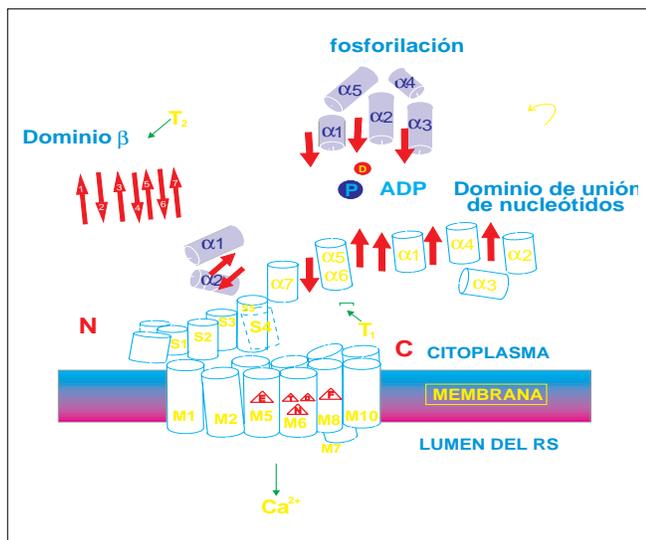


FIGURA 2. Modelo estructural de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico (Green y Stokes, 1992).

REGULACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

- * El músculo esquelético así como el sitio de la primera anomalía.
- * Evidencias de que el músculo esquelético contiene un defecto.

Se ha propuesto que anticipando una reacción de HM por medio de la activación de un agente, produce como consecuencia un incremento en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma del músculo esquelético. La rigidez muscular es casi patognomónica (características o indicativos de una enfermedad) para la HM, y al parecer depende de la contracción del músculo (Gronert, 1980). Esta respuesta se puede explicar por una activación dependiente de Ca^{2+} , y tanto el Ca^{2+} como metabolismos aeróbicos y anaeróbicos, producen como consecuencia una acidosis metabólica y respiratoria. Los estudios realizados con un electrodo de Ca^{2+} y colorantes fluorescentes de Ca^{2+} , muestran que hay un incremento de las concentraciones de Ca^{2+} mioplásmico de músculo esquelético SHM durante la exposición a halotano (Iaizzo *et al.*, 1988; López *et al.*, 1988).

Gronert *et al.* (1977) demostraron que efectivamente, el defecto de la HM reside en el músculo esquelético. Ello mediante una preparación aislada de la pata trasera de un cerdo. Estas preparaciones aisladas respondieron al desencadenamiento de la HM por medio de agentes de forma similar a la de cerdos intactos. De este modo, los músculos SHM tienen una respuesta anormal a la HM ocasionada por la activación mediante agentes en ausencia de otros factores, indicando que este tejido es el principal foco etiológico de la HM.

También se ha comprobado que las biopsias aisladas de músculos esqueléticos de especímenes SHM demuestran una creciente sensibilidad o al principio contracciones decrecientes por la exposición a varias drogas o analgésicos que activan el fenómeno de la HM incluyendo a la cafeína, succinilcolina, y al halotano. El músculo esquelético es el sitio primordial de la anomalía. Es el sitio adecuado para la administración del dantrolene sódico por el que se muestran además, los típicos episodios determinantes de la HM y de la regulación del nivel de Ca^{2+} mioplásmico en el músculo SHM (Gronert *et al.*, 1986). El dantrolene sódico, es considerado por tanto, como un agente relajante del músculo esquelético por la inhibición del proceso de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, pero esta apreciación del mecanismo de acción no está aún del todo establecido. Un reporte reciente indica que el dantrolene sódico tiene una alta afinidad a la membrana del músculo, fracción enriquecida del RyR en la cisterna final del RS (Parness y Palnitkar, 1995). Estudios muy recientes realizados con una molécula similar al dantrolene denominada acidodantrolene demuestran que se une como un ligando de gran afinidad hacia las membranas del músculo esquelético.

Experimentos de marcaje de tipo “photo-cross-linking” analizados por geles electroforéticos SDS-PAGE y posteriormente analizados por medio de una fluorografía de tritio (^3H Acidodantrolene), visualizaron una banda de proteína de aproximadamente 160 kDa. Esta proteína se sugirió como un posible receptor intracelular de dantrolene sódico. Además, se comprobó que esta proteína foto marcada comigra en Western blots con otra proteína en una reacción inmunológica de entrecruzamiento (cross-reactive) hacia un anticuerpo policlonal anti-receptor de rianodina de músculo esquelético de conejo. De esta forma, el dantrolene sódico podría estar relacionado con el receptor de rianodina de músculo esquelético (Palnitkar *et al.*, 1999). Más tarde, el equipo de Palnitkar *et al.* (1999) demostró que el dantrolene sódico se une específicamente al NH_2 -terminal del fragmento de 160 kDa del receptor de rianodina y sugieren un papel de regulación *in vivo* en la interacción de dantrolene con el RyR por medio de cortes enzimáticos con la actividad n-calpaína, así como la intervención del ATP (Paul- Pletzer *et al.*, 2001).

CAMBIOS METABÓLICOS EN EL MÚSCULO SUSCEPTIBLE A LA HIPERTERMIA MALIGNA (SHM)

Hall y Lucke (1983) demostraron en una simple biopsia de músculo de cerdo sujeta a cambios drásticos de temperatura por medio de un proceso de congelación-descongelación usando una pizca de nitrógeno líquido, que no hay diferencias significativas en el metabolismo basal del músculo SHM y músculos normales en estado latente. Hay reportes previos que indican diferencias de metabolitos en músculos SHM y músculos normales, probablemente como resultado del colapso de los metabolitos después de congelar el tejido (Ellis *et al.*, 1984; Isaacs y Heffron, 1975).

Inclusive no se encontraron diferencias en los niveles de fosfocreatina, creatina, ATP, o lactato de biopsias de músculo extraídas de personas SHM y de personas normales (Vita *et al.*, 1991). Antes de la exposición de los agentes activadores, se registran cambios rápidos entre los metabolitos intramusculares de cerdos SHM (Hall y Lucke, 1983) debido a la masiva estimulación del metabolismo aeróbico y anaeróbico (Gronert *et al.*, 1986; Gronert y Theye, 1976). Los niveles de la creatina fosfato bajan acompañados de los de ATP, se convierten en unión de creatina como el glucógeno y la creatina, ambos consumidos. Eventualmente, la acidosis, la hipercarbia, y un incremento en los niveles de catecolaminas circulantes conllevan procesos de taquicardia, arritmias cardíacas, inclusive hasta la muerte.

Hay estudios que demuestran que descansando el flexor de los músculos del antebrazo en individuos SHM presentan una significativa alza de los niveles de fosfato/fosfocreatina, relaciones que se utilizan como controles normales cuando son medidas por medio de espectroscopia de resonancia magnética nuclear $\text{RMN-}^{31}\text{P}$ (Olgin *et al.*, 1988).

En contraste, Robers *et al.* (1983) no reportaron diferencias en los niveles de fosfocreatina y de ATP, entre los músculos de un cerdo normal y los músculos de un cerdo SHM usando espectroscopia RMN-³¹P. Por otra parte, Kozak *et al.* (1991) reportaron que el pH intracelular, la fosfocreatina, y la relación fosfocreatina/fosfato disminuyó en proporción al músculo SHM de un cerdo.

En consecuencia, por no profundizar en los tejidos en el plano de los estudios por RMN, no se han podido esclarecer del todo estas diferencias en el nivel de reposo de metabolitos en los músculos SHM y en los normales.

VISIÓN GENERAL DEL ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN Y LA REGULACIÓN DE Ca²⁺ EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El complejo excitación-contracción del músculo esquelético es un proceso por el cual la despolarización de la superficie de la membrana se da junto con liberación de Ca²⁺ del RS. Aunque una comprensión de las anomalías presentes en el músculo SHM requiere de un entendimiento del complejo de excitación-contracción (Mickelson y Louis, 1996). Hay un sinnúmero de excelentes artículos publicados relacionados con el tema (Mickelson y Louis 1996; Ashley *et al.*, 1991; Melzer *et al.*, 1995; Ríos *et al.*, 1991; Ríos y Pizarro, 1991). Una amplia red membranar que conforma la cadena de los túbulos transversos (túbulos-T) invagina del sarcolema hacia la fibra interior a intervalos regulares y sirve para desplegar rápidamente un potencial de acción hacia el interior de la fibra muscular (figura 1). Incluso estas membranas actúan como una barrera de Ca²⁺ extracelular milimolar, asegurando el restablecimiento del Ca²⁺ sarcoplásmico remarcado en un intervalo nM. Este fenómeno también se presenta en la membrana plasmática de otros tipos de células. Tanto el sarcolema como las membranas de los túbulos transversos presentan transporte dependiente de Ca²⁺, cuya función es liberar Ca²⁺ hacia fuera de la fibra muscular (Ervasti *et al.*, 1989; Mickelson *et al.*, 1987). Además, se ha descrito la actividad del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ en la superficie de las membranas del músculo esquelético (Ervasti *et al.*, 1989; Mickelson *et al.*, 1986)

Los túbulos transversos tienen una alta densidad de canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje, ausentes en el sarcolema (Sanchez y Stefanl, 1978), por lo que su activación es lenta durante un potencial de acción, resultando en un flujo de Ca²⁺ lento desde la pared interna de retículo sarcoplásmico hacia fuera de la membrana externa. Estas proteínas son receptoras para varias importantes clases de bloqueadores de canales de Ca²⁺, incluyendo las dihidropiridinas, (nitrendipina o PN200-110), fenilalquilaminas, (verapamil o D600), y benzodiazepinas (diltiazem), y son común-

mente llamadas “receptores de dihidropiradina” (DHPR) (figuras 1 y 3). El DHPR de músculo esquelético de conejo está conformada de varias subunidades de masas moleculares de 170, 150, 52 y de 32 kDa, determinadas como a₁, a₂, b y g respectivamente, y se encuentran en una relación de 1:1:1:1; además, una quinta subunidad d que se derivada de a₂ por un proceso proteolítico (Campbell *et al.*, 1988; Catteral, 1991). La subunidad a₁ tiene una actividad de canal y se une a los bloqueadores de Ca²⁺, al mismo tiempo las otras subunidades cooperan para modular estas actividades. Un cambio estructural en el DHPR, es detectado como un movimiento intramembranal asociado a carga, acompañado de un cambio en el potencial de membrana, para activar los niveles y la aparición necesaria de Ca²⁺ para su salida del RS (Adams *et al.*, 1990; Ohinishi y Ohnishi, 1993; Tanabe *et al.*, 1988) (figura 1). El RS es el principal responsable de la regulación de la concentración de Ca²⁺ sarcoplásmico (Mickelson y Louis, 1996).

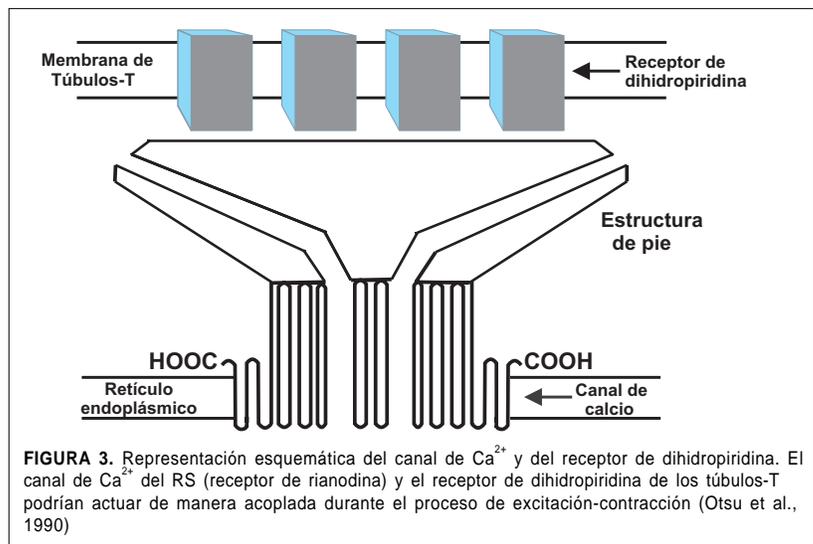


FIGURA 3. Representación esquemática del canal de Ca²⁺ y del receptor de dihidropiridina. El canal de Ca²⁺ del RS (receptor de rianodina) y el receptor de dihidropiridina de los túbulos-T podrían actuar de manera acoplada durante el proceso de excitación-contracción (Otsu *et al.*, 1990)

TRATAMIENTO

El dantrolene sódico fue sintetizado como un posible antídoto (Denborough, 1998). El principio bajo el cual se eligió esta droga se basó en un estudio realizado en ratones donde se demostró que inyectándoseles induce la flacidez del músculo, y por tanto se dedujo que este efecto remarcable se debe a la inhibición del complejo E-C (complejo excitación-contracción) en el músculo esquelético (Ellis y Bryant, 1972) sin un efecto sobre la transmisión neuromuscular o las propiedades eléctricas del músculo. Para un eficaz tratamiento de una crisis de HM en humanos y cerdos se deben usar concentraciones de dantrolene que sean detectables en sangre, tener archivos clínicos de los pacientes, así como de las características propias a las crisis: Causas completas de la crisis, así como a la mano las drogas y herramientas necesarias para el tratamiento, reactivos necesarios para las pruebas de detección de la SHM *in vitro* como son la cafeína, halotano y sustancias de relajación (Austin y Denborough, 1977; Harrison 1975; Kolb *et al.*, 1982).

Diversas drogas pueden desencadenar manifestaciones semejantes a la HM: neurolépticos, colapso circulatorio, arritmias cardíacas, disturbios en la homeostasis (coagulación vascular diseminada), insuficiencia renal aguda. Las manifestaciones fulminantes frecuentes y eventuales contribuyen a agravar la HM.

Tratamiento de una crisis de HM (Gomez do Amaral, 2000).

1. Interrupción a la exposición de los agentes desencadenantes.
2. Hiperventilación con oxígeno al 100%.
3. Dantrolene sódico: hasta 10 mg/Kg fraccionados en dosis de 2 mg/Kg.
4. Control de las complicaciones:
 - a) Acidemia: bicarbonato de sodio (2-4 mEq/Kg/IV), hiperventilación.
 - b) Hiperpotasemia: CaCb (10ccIV), glucosa (50%, 50 cc), insulina (5-10 UIV), bicarbonato, hiperventilación.
 - c) Insuficiencia renal aguda: Hidratación, diuréticos.
 - d) Arritmias cardíacas: antiarrítmicos, corrección de hiperpotasemia.
 - e) Estado de choque: dragas cardiotónicas y vasoactivas.
5. Prevención de la crisis:
 - a) Observación en el centro de terapia intensiva.
 - b) Dantrolene sódico 1mg/Kg IV cada 6 horas, durante 48 horas.

Prevención (cuidados con susceptibilidad confirmada)

1. Cuando sea posible, considerar confirmación del diagnóstico (biopsia muscular).
2. Evitar exposición a agentes desencadenantes.
3. Monitorización de capnografía de la temperatura.
4. Garantizar la disponibilidad inmediata del dantrolene sódico. Una administración profiláctica de dantrolene restringida a situaciones excepcionales.
 - a) Historia personal del paciente que ingresa con un episodio de HM desencadenada por motivo de estrés.
 - b) Disfunción cardiocirculatoria o renal que torne al paciente incapaz de tolerar la fase inicial de un episodio de la HM.

PRONÓSTICO

La HM es asociada a una mortalidad por encima del 70%. Un diagnóstico precoz por tratamiento específico hace posible reducirla a menos del 10%.

COMENTARIOS

Este trabajo se realizó con la finalidad de disponer de información sobre la HM, ya que como es común en diferentes biblio-

grafías sólo se tocan los aspectos fisiológicos convencionales, por lo que nos vimos en la necesidad de recopilar lo más relevante sobre el tema, principalmente en aspectos generales y con la facilidad del idioma español.

Las causas por las cuales los individuos puedan presentar una susceptibilidad a la HM, no están del todo claras, sin embargo, se han logrado importantes avances, tales como la posibilidad de salvar vidas; mas no debemos ser conformistas con lo que ya se ha logrado, y buscar día con día la posibilidad de prevenir los efectos de este temible mal en individuos susceptibles.

Esperamos de antemano que este sencillo trabajo de revisión sirva para orientar un poco a todas aquellas personas que dediquen su tiempo a este tipo de estudios, especialmente a estudiantes y profesores de las áreas biomédicas que desconocen el tema, y así abrir la posibilidad de que algunos se interesen en el área de su investigación, para que pacientes susceptibles tengan la posibilidad de seguir viviendo durante la aplicación de alguna anestesia. Además, cabe mencionar el impacto económico de esta enfermedad debido a que ciertas especies animales de importancia económica para el hombre, presentan HM.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, B. T., Tanabe, A., Mikami, S. y Beam, K. "Intramembrane charge movement restored in dysgenic muscle by injection of dihydropyridine receptor complementary DNAs". *Nature Lond*, 1990. Pp. 346, 569-572.
- Allen, G. C., Fletcher J. E., Huggins, F. J., Conti, P. A. y Rosenberg, H. "Caffeine and halothane contracture testing in swine using the recommendations of the north american malignant hyperthermia group". *Anesthesiology*, 72, 1990. Pp. 71-76.
- Ashley, C. C., Mulligan, I. P. y Lea, T. J. "Leal Ca²⁺ and activation mechanisms in the skeletal muscle". *Q. Rev. Biophys*, 24, 1991. Pp. 1-73.
- Austin, K. L. y Denborough, M.A. "Drug treatment of malignant hyperpyrexia. Anaesth". *Intens. Care*, 3, 1977. Pp. 207-213.
- Berk, S. E., Lytton, J., MacLennan, D.H. y Shull, G. E. "cDNA cloning functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump". *J. Biol. Chem.*, 264, 1989. Pp. 18561-18568.
- Berridge, M. J. "Elementary and global aspects of calcium signalling". *J. Physiol.*, 449, 1993. Pp. 291-306.
- Brandl, C. J., DeLeon, S., Martin, D. R. y MacLennan, D. H. "Adult forms of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum". *J. Biol. Chem.* 262, 1987. Pp. 3468-3474.

- Britt, B. A. "Dantrolene: an up date". In: *Malignant Hyperthermia*, edited by B. A. Britt. Boston, Mass: Martinus Nijhoff, 1987. Pp. 325-368.
- Britt, B. A. y Kalow, W. "Malignant hyperthermia: a statistical review". *Can. Anesth. Soc. J.* 17, 1970. Pp. 293-315.
- Burk, S. E., Lytton, J., MacLennan, D.H. y Shull, G.E. "cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution expression of a third organellar Ca²⁺ pump". *J. Bio. Chem.*, 264, 1989. Pp. 18561-18568.
- Campbell, K. P., Leung, A. T. y Sharp, A. H. "The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine sensitive calcium channel". *Trends. Neurol. Sci.* 11, 1988. Pp. 425-430. Carafoli, E. "Intracellular calcium homeostasis". *Ann. Rev. Biochem.* 56, 1987. Pp. 395-433.
- Catterall, W. A. "Functional subunit structure of voltage-gated calcium channels". *Science Wash. DC.* 253, 1991. Pp. 1499-1500.
- Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* 80, 1995. Pp. 259-268.
- Denborough, M. "Malignant Hyperthermia". *Lancet*, 352, 1998. Pp. 1131-1136.
- Deufel T, Golla A, Iles D. et al. "Evidence for genetic heterogeneity of malignant hyperthermia susceptibility". *Am. J. Genet.* 50, 1992. Pp. 1151-1161.
- Ellis F. R., Harriman D. G. F., Keaney, N. P., Kyei-Mesah, K. y Tyrrell, N. J. H. "Halothane induced muscle contracture as a cause hyperpyrexia". *Br. J. Anaesth.* 43, 1971. Pp. 721-724.
- Ellis, F. R. y Harriman, D. G. F. "A new screening test for susceptibility to malignant hyperpyrexia". *Br. J. Anaesth.* 45, 1973 P. 638.
- Ellis, F. R., Halsall, P. J., Allam, P. y Hay, E. "A biochemical abnormality found in muscle from unstressed malignant hyperthermia susceptible human". *Biochem. Soc.* 12, 1984. Pp. 357-358.
- Ellis, K.O. y Bryant. S.H. "Excitation-contraction uncoupling in skeletal muscle by dantrolene sodium". *Naunyn-Schmiede Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 274, 1972. Pp. 107-109.
- Enzmann, N. R., Balog, E. M. y Gallant, E. M. "Malignant hyperthermia: effects of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump inhibition". *Muscle Nerve* 21, 1998. Pp. 361-366.
- Ervasti, J. M., J. R. Mickelson y Louis, C. F. Transverse tubule calcium regulation in malignant hyperthermia. *Arch. Biochem Biophys.*, 269, 1989. Pp. 487-506.
- European Malignant Hyperpyrexia Group. "A protocol for the investigation of hyperpyrexia (HM) susceptibility". *Br. J. Anesth.* 56, 1984. Pp. 1267-1269.
- Fabiato, A. "Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum". *Am. J. Physiol.*, 245, 1983. Pp. C1-C4.
- Fernández-Belda, F., Plenge-Tellechea, F., Fortea, I. Y Soler, F. "La señal bioquímica del calcio". *An. Vet. (Murcia, Spain)* (1997-1998) 13-14, 23-34.
- Fraser, C. M., Mays, A., Huebner, R. H. et al. *El manual de Meck de Veterinaria*. Tercera edición española. Inc. USA. Edit. Centrium, 1988. 1918 pp.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., De Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., O'Brien, P. J. y MacLennan, D. H. "Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia". *Science Wash.*, 253, 1991. Pp. 448-451.
- Ghosh, A. y Greengerg, M. E. "Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms end cellular consequences". *Science* 268, 1995. Pp. 239-247.
- Gomez Do Amaral, J. L. "Hipertermia maligna". *Virtual Med News*, www.vmed.com.br/hiper.htm. 1-3. 2000.
- Gronert, G. A. "Malignant hyperthermia". *Anesthesiology* 53, 1980. Pp. 395-423.
- Gronert, G. A. "Malignant hyperthermia". In: *Myology*, edited by A. G. Engel and B. Q. Banker. New York: McGraw Hill, 1986. Pp. 1763-1784.
- Gronert, G. A. y Theye R. A. "Halothane-induced porcine malignant hyperthermia: metabolic and hemodynamic changes". *Anesthesiology*, 44, 1976. Pp. 36-43.
- Gronert, G. A. y Theye, R. A. "Halothane induced porcine malignant hyperthermia: metabolic and hemodynamic changes". *Anesthesiology* 47, 1976. Pp. 411-415.
- Gronert, G. A., Ahern, C. P. y Milde J. H. "Treatment of porcine malignant hyperthermia: lactate gradient from muscle to blood". *Can. Anaesth. Soc. J.*, 33, 1986. Pp. 729-736.
- Gronert, G. A. *Myology*, edited by A. G. Engel and C. Franzini Armstrong. New York: MacGraw-Hill, 1994. Pp. 1661-1668.
- Gronert, G. A., Milde, J. H. y Theye, R. A. "Role of sympathetic activity in porcine malignant hyperthermia". *Anesthesiology* 47, 1977. Pp. 411-415.
- Gronert, G. A., Thomson R. L. y Onofrio, B. M. "Human malignant hyperthermia: awake episodes and correction by dantrolene". *Anesth. Analg.* 59, 1980. Pp. 377-378.
- Haan, E. A., Freemantle, C. J., McCure, J. A., Friend, K. L. y Mulley, J. C. "Assignment of the gene for central core disease to chromosome 19". *Hum. Genet.* 86, 1990. Pp. 187-190.

- Hall, G. M. y Lucke, J. N. "Porcine malignant hyperthermia". IX changes in the concentrations of intramuscular high-energy phosphate, glycogen, and glycolytic intermediates. *Br. J. Anaesth.* 55, 1983. Pp. 635-640.
- Hall, L. W., Woolf, M., Brandley, J. W. y Jolly D. W. "Unusual reaction to suxamethonium chloride". *Br. Med. J.* 2, 1966. P. 1305.
- Harrison, G. G. "Control of malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium". *Br. J. Anaesth.*, 1975.
- Harrison, G. G., Biebuyck, J. F., Terblanche, J., Dent, D. M., Hickman R. y Saunders, S. J. "Hyperpirexia during anaesthesia". *Br. Med. J.* 3, 1968. Pp. 594-595.
- Iaizzo, P. A., Klein y Lehmann-Hort F. "Fura-2 detected myoplasmic calcium and its correlation with contracture force in skeletal muscle from normal and malignant hyperthermia susceptible pigs". P. Fuegers. *Arch.* 411, 1988. Pp. 648-653.
- Inesi, G. y Kirtley, M. R. "Structural features of cation transport ATPases". *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 1992. Pp. 271-283.
- Isaacs, H. y Heffron, J. J. A. "Morfological and biochemical defects in muscle of human carriers of the malignant hyperthermia syndrome". *Br. J. Anaesth.* 47, 1975. Pp. 475-481.
- Kalow, W., Britt, B. A. y Chan F. Y. "Epidemiology and inheritance of malignant hyperthermia". *Int. Anesthesiol. Clin.* 17, 1979. Pp. 119-139.
- Kalow, W., Britt, B. A., Terreau, M. E. y Haist, C. "Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia". *Lancet.* Pp. 895-898.
- Kolb, M.S., Horne, M. L. y Martz, R. "Dantrolene in human malignant hyperthermia". *Anesthesiology.* 56, 1982. Pp. 254-62.
- Kozar-Reiss, G., Desmoulin, F., Martin, C. F., Monin, G., Renou, J. P., Canioni, P. y Cozzone, P. J. "In vitro correlation between force and energy metabolism in porcine malignant hyperthermic muscle studied by ^{31}P NMR". *Arch. Biochem.* 287, 1991. Pp. 312-319.
- Kretsinger, R. H. "Structure and evolution of calcium modulated proteins". *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8, 1980. Pp. 119-174.
- Larach, M. G. et al. "A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility". *Anesthesiology,* 80, 1994. Pp. 771-779.
- Lopez, J. R., Allen, P. D., Alamo, Jones, D. y Sreter F. A. "Myoplasmic free $[\text{Ca}^{2+}]$ during a malignant hyperthermia episode in swine". *Muscle Nerve,* 11, 1988. Pp. 82-88.
- MacLennan, D. H., Phillis, M. S., y Zhang Y. "The genetic and physiological basis of malignant hyperthermia". In: *Molecular biology and membrana biology of membrane transport disorders.* Edited by S. G. Schultz, T. E. Andreoli, A. M. Brown, D. Fambrough, J. Hoffman, and M. J. Welsh. New York: Plenum, 1995.
- MacLennan, D.H, Duf, C. y Zorzato, F. et al. "Ryanodine receptor is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia". *Nature,* 343, 1990. Pp. 562-561.
- McCarthy, T. V., Healy, J. M. S. y Heffron, J. J. A. et al. "Ryanodine receptor is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia". *Nature,* 343, 1990. Pp. 562-564.
- McCleskei, E. W. "Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms". *Curr. Opin. Neurobiol.,* 4, 1994. Pp. 304-312.
- McIntosh, D. B., Berman, N. C. y Kench J. E. "Characteristics of sarcoplasmic reticulum from slowly glycolysing and from rapidly glycolysing pig skeletal muscle post mortem". *Biochem. J.* 166, 1977. Pp. 387-398.
- McPherson, P.S. y Cambell, D.P. "The ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel". *J. Bio. Chem.,* 22, 1993. Pp. 44-56.
- Meissner, G. "Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors". *Ann. Rev. Physiol.* 56, 1994. Pp. 485-508.
- Melzer, W., Hermann-Frank, A. y Luttgav, H. C. "The roles of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibers". *Biochim. Biophys. Acta.* 1241, 1995. Pp. 59-116.
- Mickelson, J. R., Ross, J. A., Reed, B. K. y Louis, C. F. "Enhanced Ca^{2+} induced calcium release by isolated sarcoplasmic reticulum vesicles from malignant hyperthermia susceptible pig muscle". *Biochim. Biophys. Acta.* 862, 1986. Pp. 318-328.
- Mickelson, J. R., Thatte, H. S., Beaudry, T. M., Galant, E. M. y Louis, C. F. "Increased skeletal muscle acetylcholinesterase activity in porcine malignant hyperthermia". *Muscle Nerve,* 10, 1987. Pp. 723-727.
- Mickelson, R. J. y Louis, Ch. F. "Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca^{2+} release channel, and cell Ca^{2+} regulations defects", 76, 1996. Pp. 537- 592.
- Ohnishi, S. T. y Ohnishi T. *Malignant hiperthermia, a genetic membrana disease.* Boca Raton, Fl: CRC., 1993. Pp. 1-329.
- Olgin, J., Argov, Z., Rosemberg, H., Tuchler, M. y Chance, B. "Non-invasive evaluation of malignant hyperthermia susceptibility and phosphorous nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Anesthesiology,* 68, 1988. Pp. 507-513.

Ording, H. "Incidence of malignant hyperthermia in Denmark". *Anesth. Analg.*, 64, 1985. Pp. 700-704.

Otsu, K., Philips, MS., Khanna, VK., DeLeon, S. y MacLennan DH. "Refinement of diagnostic essays for a probable causa mutation for porcine and human malignant hyperthermia". *Genomics.*, 13, 1992. Pp. 835-37.

Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. J., Zorzato, F., Green, N. M., y MacLennan, D. H. "Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum". *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 13472-13483.

Palnitkar, S. S., Bin, B., Jimenez, L. S., Morimoto, H., Williams, P. G., Paul-Pletzer, K. y Parness, J. "[³H]Azidodantrolene: synthesis and use in identification of a putative skeletal muscle dantrolene binding site in sarcoplasmic reticulum". *J. Med. Chem.*, 42, 1999. Pp. 1872-1880.

Parness, J. y Palnitkar, S. S. "Identification of dantrolene binding sites in porcine skeletal muscle sarcoplasmic reticulum". *J. Biol. Chem.*, 270, 1995. Pp. 18465-18472

Paul-Pletzer, K., Palnitkar, S. S., Jimenez, L. S., Morimoto, H. y Parness, J. "The skeletal muscle ryanodine receptor identified as a molecular target of [³H]Azidodantrolene by photoaffinity labeling". *Biochem.*, 40, 2001. Pp. 531-542.

Pedersen, P. L. y Carafoli, E. "Ion motive ATPases. I. Ubicuity, properties, and significance for cell function". *Trends Biochem. Sci.*, 12, 1987. Pp. 146-150.

Plenge-Tellechea, L. F. "Mecanismos moleculares de inhibición de ATPasas transportadoras de Ca²⁺". Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de Murcia, España, 1998. Pp. 1-42.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. y Meldolesi, J. "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores". *Physiol. Rev.* 74, 1994. Pp. 595-636.

Putney, J. W., Jr. y Bird, G. S. J. "Calcium influx and its control by calcium release". *Curr. Opin. Neurobiol.*, 3, 1993. Pp. 368-374.

Quane, KA., Keating, KE., Manning BM, et al. "Detection of a novel common mutant in the ryanodine receptor gene in malignant hyperthermia: implications for diagnosis and heterogeneity studies". *Hum. Mol. Genet.*, 3, 1994. Pp. 471-76.

REFERENCIAS

Rios, E., Ma, J. y Gonzales, A. "The mechanical hypothesis of excitation-contraction (EC) coupling in the skeletal muscle". *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 12, 1991. Pp. 127-135.

Rios, E., y Gonzales, A. "Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle". *Nature Lond.* 325, 1987. Pp. 717-720.

Rios, E., y Pizarro, G. "Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle". *Physiol. Rev.* 71, 1991. Pp. 849-906.

Roberts, J. T., Burt, T., Gouylai, L., Chance, B., Sreter, F. A. y Ryan, J. F. "Immediate uncoupling of high energy oxidative phosphorylation in muscle of malignant hyperthermia swine determined noninvasively by whole body ³¹P Nuclear Magnetic Resonance". *Anesthesiology*, 59, 1983. A230.

Sanchez, J. y Stefani, E. "Inward calcium current in twich muscle fibers of the frog". *J. Physiol. Lond.* 283, 1978. Pp. 197-209.

Schneider, M. F. "Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers". *Ann. Rev. Physiol.*, 56, 1994. Pp. 463-484.

Stedman et al. *Diccionario de ciencias médicas ilustrado*. 25 ed. Médica Panamericana, 1993.

Sutko, JL., Ito, K. y Kenyon, JL. "Rianodine: a modifier of sarcoplasmic calcium realease in striated muscle. *Fed. Proc.*, 1985. Pp. 2984-88.

Tanabe, T., Beam, K. G., Powell, J. A. y Numa, S. "Restoration of exitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenetic muscle by dihydropyridine receptor cDNA". *Nature Lond.* 336, 1988. Pp. 134-139.

Tsien, R. W. y Tsien, R. Y. "Calcium channels, stores, and oscillations". *Ann. Rev. Cell Biol.*, 6, 1990. Pp. 715-760.

Vita, G. M., Fletcher, J. E., Tripolitis, L., Rosenberg, H. y Conti, P. A. "Altered [³H]ryanodine binding is not associated with malignant hyperthermia susceptibility in terminal cisternae preparations from swine". *Biochem. Int.*, 23, 1991. Pp. 563-570.

Zozato, F., Fujii, J., Otsu, K., Phillips, M., Green, N. M., Lai, F. A., Meissner, G. y MacLennan, D. H. "Molecular cloning of DNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum". *J. Biol. Chem.*, 265, 1990. Pp. 2244-2256.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por toda la ayuda que me ha brindado para la realización de este material. A mi esposa Martha por apoyarme en todo momento y darme los ánimos para salir adelante. A mi comunidad de la Parroquia Nuestra Señora de la Luz. A la UACJ por su apoyo y fortalecimiento en mi formación. Al Dr. Francisco Fernández Belda. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 30111-N).

Luis Fernando Plenge

SUPRESIÓN DE CENTROSOMAS PATERNOS DURANTE La meiosis en ovocitos

José Luis Stephano y Meredith Gould¹

Hay algunas evidencias en el gusano marino urechis caupo de que la MAPK suprime al centrosoma masculino durante la meiosis en los ovocitos.1.- Cuando sube la actividad de la MAPK durante meiosis, es el tiempo exacto en que permanece suprimido el centrosoma del espermatozoide.2.- Cuando baja la actividad de la MAPK es cuando termina la meiosis y crece el áster del centrosoma paterno y se moviliza hasta el centro del ovocito.3.- Cuando se inhibe la actividad de la MAPK con U0126 y PD98059 el áster masculino crece prematuramente durante la meiosis y el pronúcleo masculino es arrastrado hacia el centro del ovocito.4.- Cuando se inhibe la MAPK por un método diferente (cambios de pH), los centrosomas del espermatozoide se liberan de su supresión y forman ásteres prematuramente, así como se movilizan los núcleos masculinos hacia el centro del ovocito.5.- Cuando se inhibe la MAPK en ovocitos de ostión y estrella de mar durante la meiosis, se observan los mismos efectos.6.- Cuando se revisa la literatura se encuentra que la MAPK se activa durante la meiosis desde la ruptura de la vesícula germinal hasta el segundo cuerpo polar en humanos, bovino, ratón, Xenopus, ascidia, almeja y los ásteres masculinos (femeninos en ratón) crecen durante o después de la formación del segundo cuerpo polar. Con base en estos datos y los experimentales de Urechis, ostión y estrella de mar, se puede proponer que el mecanismo de supresión del centrosoma del espermatozoide es debido a la MAPK, y es universal.

Desde el siglo pasado es conocido (Wilson, 1928) que en los animales que se fecundan antes de que termine la meiosis (ver tabla 1), el espermatozoide (centrosoma y núcleo) tienen que esperar en la periferia del ovocito hasta terminar la meiosis (formación de dos cuerpos polares). Esta supresión del espermatozoide es muy importante para que no interfiera con la meiosis.

Cuando termina la meiosis, el centrosoma del espermatozoide forma un áster grande y el núcleo se mueve al centro del ovocito para fusionarse con el pronúcleo femenino para continuar con el desarrollo de un nuevo organismo. Sin embargo, el mecanismo que mantiene al espermatozoide y su centrosoma en espera reprimidos en la periferia mientras los centrosomas del ovocito están activamente formando husos y ásteres en el mismo citoplasma, fue desconocido.

Al igual que en otros animales, en el gusano marino *Urechis caupo* el núcleo paterno y su centrosoma permanecen en la periferia del ovocito y no crece su áster y no se movilizan hasta que termina la meiosis. A continuación en las siguientes figuras presentamos las evidencias de este hecho.

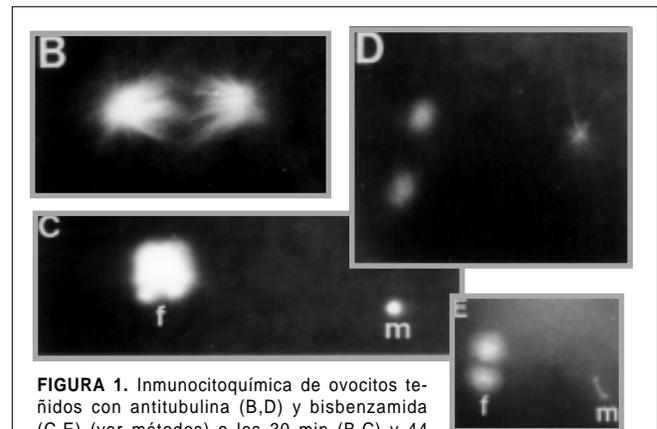
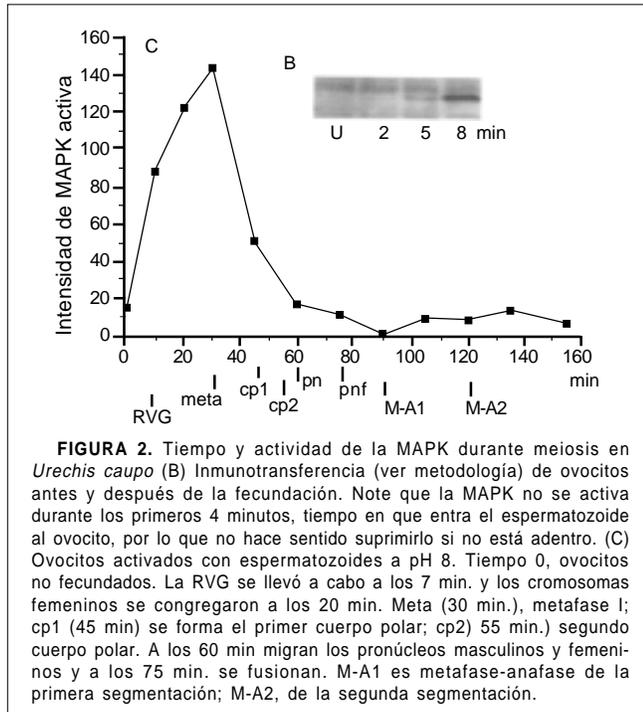


FIGURA 1. Inmunocitoquímica de ovocitos teñidos con antitubulina (B,D) y bisbenzamida (C,E) (ver métodos) a los 30 min (B,C) y 44 min (D,E) después de la fecundación. En (B), los ásteres femeninos se han movido a la periferia. (C) es el mismo ovocito que en (B) pero teñido con bisbenzamida (que tiñe DNA). Como se puede ver en (C) si está presente en la periferia el pronúcleo masculino (m), pero carece de áster (ver B). F, cromosomas femeninos en metafase I de meiosis. (D,E) telofase de meiosis II. El áster masculino es claramente visible en todos los ovocitos estudiados (D). La cromatina paterna (E,m) aparece más periférica que el áster del espermatozoide (D) y más alargada como si empezara a ser arrastrado por su áster hacia el centro del ovocito. (E) Note que es telofase de meiosis II cuando el áster del espermatozoide crece.

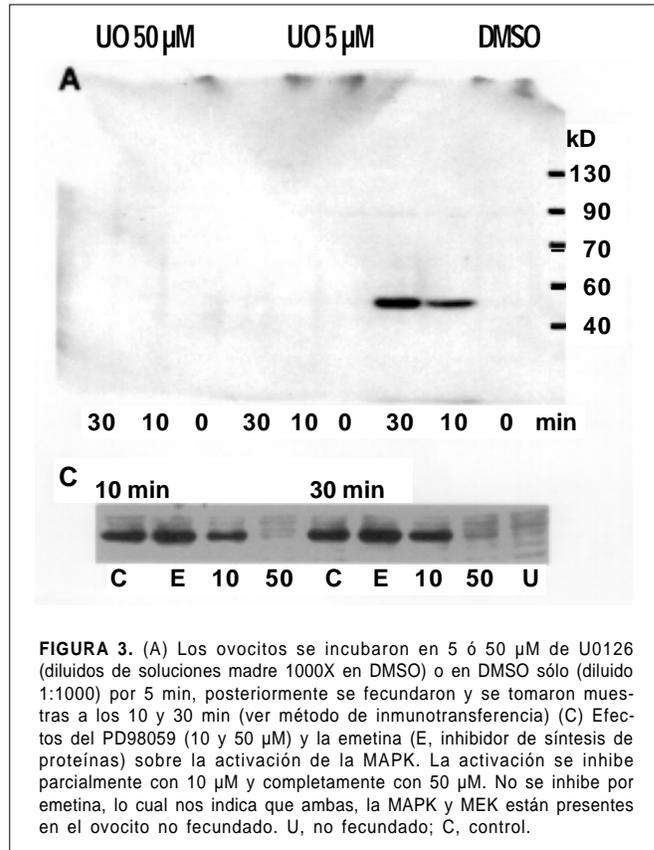
¹ Profesores e investigadores del Instituto de Biología Celular y Molecular, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., C.P. 22800. A.P. 2921. angould@faro.ens.uabc.mx

Evidencias en Urechis caupo de que la MAPK (enzima cinasa de actividad mitogénica) es la responsable de mantener suprimidos al núcleo paterno y su centrosoma durante la meiosis.

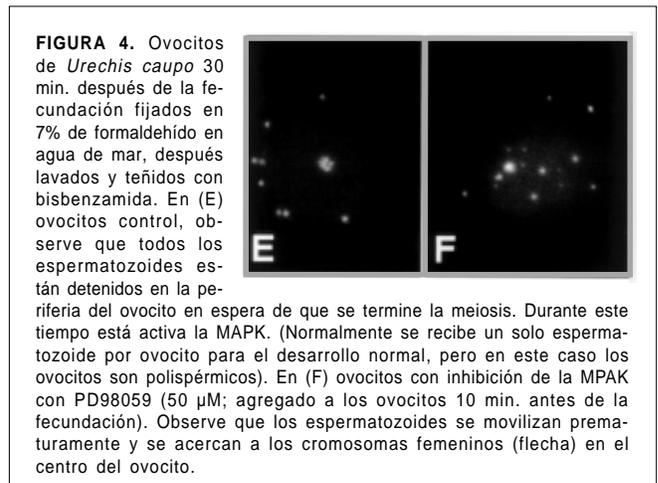
Evidencia 1. La MAPK aumenta su actividad antes de la RVG (Ruptura de la Vesícula Germinal) y disminuye su actividad durante la formación del segundo cuerpo polar (ver figura 2, tabla 1). Durante este tiempo el centrosoma masculino permanece suprimido en la periferia del ovocito a la espera de que éste termine la meiosis. En conclusión, el tiempo que se mantiene activa la MAPK durante la meiosis, está correlacionado con el tiempo exacto de la supresión del áster masculino.



DEMOSTRACIÓN DE QUE EL U0126 Y PD98059 INHIBEN MAPK



Evidencia 2. Cuando se inhibe la MAPK con U0126 o PD98059 (inhibidores específicos de MEK, la enzima que fosforila y activa la MAPK) después de la fecundación, los ásteres masculinos crecen inmediatamente y el núcleo paterno se moviliza hacia el centro del ovocito para intentar fusionarse con los cromosomas femeninos (ver figuras 4 y 5).



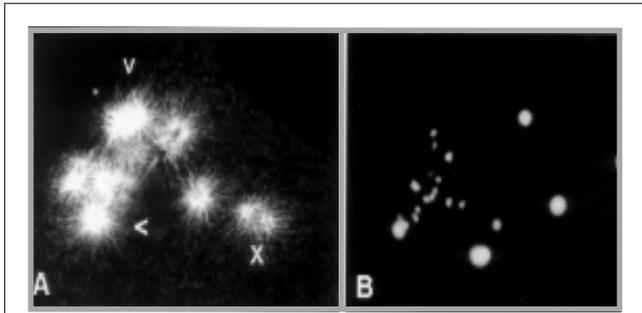


FIGURA 5. Efecto de la inhibición de MAPK por PD98059 (50 μ M; agregado 10 min. antes de la fecundación). (A) 30 min. después de la fecundación se observan grandes ásteres paternos cerca de los ásteres maternos (flechas). Uno de los ásteres paternos (X) se ve claramente doble. (B) El mismo ovocito teñido con bisbenzamida. Los cromosomas femeninos aparecen tirados y se ven 5 pronúcleos masculinos. (Compare con la figura 1 B,C, 30 min. después de la fecundación sin inhibición de la MAPK). También se detectaron ásteres masculinos grandes a solamente 10 min. después de la fecundación (datos no mostrados).

Evidencia 3. Otra evidencia de que la MAPK es la responsable de suprimir el centrosoma masculino viene de experimentos donde no se utilizaron los inhibidores. En estos experimentos nosotros transferimos los ovocitos a agua de mar pH 7 después de fecundarlos a pH 8 (el pH normal).

Por este método, la liberación de protones se interrumpe y el ovocito no alcanza el aumento en pH intracelular requerido para activar la MAPK aunque hay RVG. En estos ovocitos también los ásteres masculinos se forman prematuramente (figura 6). En conclusión se puede decir que por un método enteramente diferente de inhibición de la MAPK, también el áster masculino crece prematuramente.

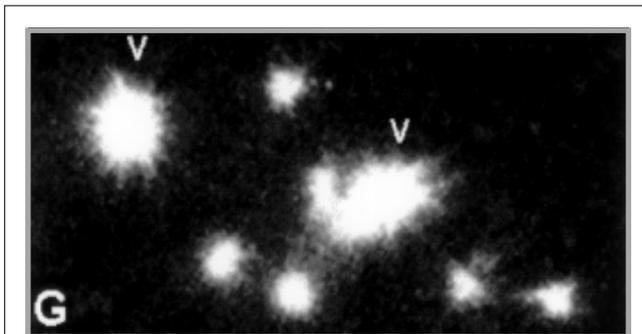


FIGURA 6. Ovocitos fecundados a pH 8 y transferidos a pH 7, 2 min. después, tratamiento que inhibe la activación de la MAPK. Posteriormente fueron fijados a los 30 min. y teñidos con antitubulina. Compare con las figuras 1B,C y 5, A,B. Flechas, centrosomas maternos.

Evidencias en otros organismos. Dado los resultados de este descubrimiento encontrado en *Urechis*, nosotros nos preguntamos si este mecanismo de supresión de ásteres masculinos era universal, para lo cual realizamos experimentos en especies evolutivamente distintas, un molusco (ostión *Crassostrea gigas*) y un equinodermo (estrella de mar *Asterina miniata*).

Encontramos los mismos resultados que en el gusano marino. Los inhibidores de la activación de la MAPK hacen que el centrosoma masculino crezca prematuramente y que el pronúcleo masculino se movilice hacia el centro del ovocito, lo que nos permite concluir que la MAPK se encarga de suprimir el centrosoma masculino mientras el ovocito termina la meiosis. Una vez que está terminada, la MAPK se inactiva para permitir el crecimiento de ásteres a partir de centrosomas (ver figuras 7 y 8).

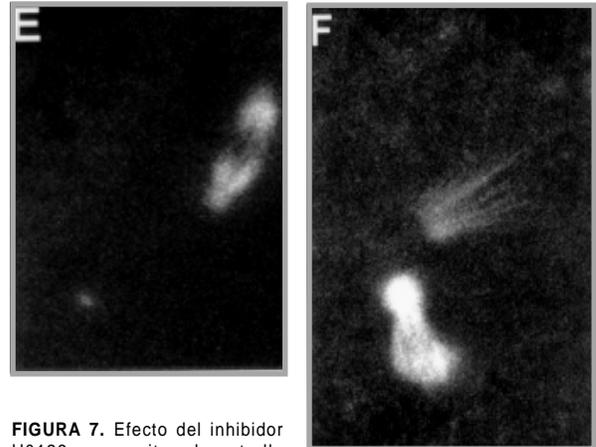


FIGURA 7. Efecto del inhibidor U0126 en ovocitos de estrella de mar (*Asterina miniata*). (E) ovocito control 43 min. después de la fecundación. Está en metafase I de la meiosis, un pequeño áster del espermatozoide es visible. (F) Ovocitos tratado con U0126 del mismo experimento a los 43 min después de la fecundación. Un áster grande masculino parecido a un cometa está muy cerca de los centrosomas del ovocito.

Figuras con el permiso de Academic Press.

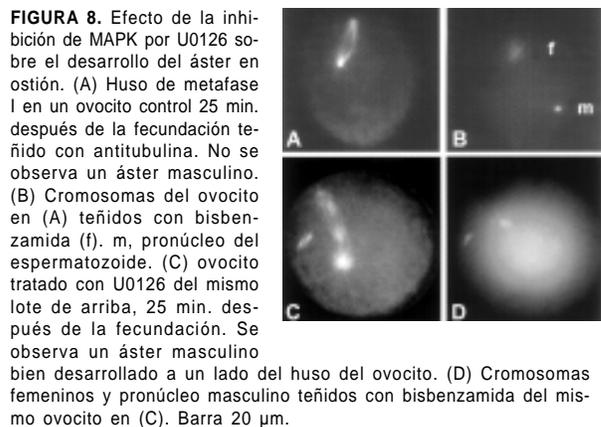
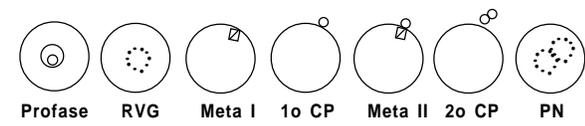


FIGURA 8. Efecto de la inhibición de MAPK por U0126 sobre el desarrollo del áster en ostión. (A) Huso de metafase I en un ovocito control 25 min. después de la fecundación teñido con antitubulina. No se observa un áster masculino. (B) Cromosomas del ovocito en (A) teñidos con bisbenzamida (f), m, pronúcleo del espermatozoide. (C) ovocito tratado con U0126 del mismo lote de arriba, 25 min. después de la fecundación. Se observa un áster masculino bien desarrollado a un lado del huso del ovocito. (D) Cromosomas femeninos y pronúcleo masculino teñidos con bisbenzamida del mismo ovocito en (C). Barra 20 μ m.

Si se revisa la literatura, se encuentra que en todas las especies estudiadas, la MAPK se mantiene activa desde la RVG hasta la formación del segundo cuerpo polar, tiempo en que los centrosomas de los espermatozoides se mantienen suprimidos

en la periferia del ovocito (tabla 1). También en todos estos organismos, el centrosoma paterno forma ásteres durante o después de la formación del segundo cuerpo polar (tabla 1).

TABLA 1
MAPK y Supresión de centrosomas paternos durante la meiosis



Organismo	Fecund	Act MAPK	Inact MAPK	Crece áster
Humano	Meta II	A Meta II	D 2º CP	D 2º CP
Bovino	Meta II	A Meta II	D 2º CP	D 2º CP
Cerdo	Meta II	¿?	¿?	D 2º CP
Ratón	Meta II	D RVG	D 2º CP	D 2º CP (materno)
Xenopus	Meta II	D RVG	2º CP	2º CP
Ascidia	Meta I	A Meta I	2º CP	2º CP
Estrella	Meta I	D RVG	2º CP	2º CP
Camarón	Meta I	¿?	¿?	2º CP
Urechis	Profase	A RVG	2º CP	2º CP
Ostión	Profase	A RVG	2º CP	2º CP
Spisula	Profase	A RVG	2º CP	2º CP

En ratones, donde la herencia del centrosoma es materna, no se forman ásteres hasta después de la formación del segundo cuerpo polar (tabla 1). En conclusión, se puede decir que la inhibición del centrosoma paterno (o materno en el caso de roedores) por MAPK durante la meiosis es un mecanismo universal. Sin embargo habría que demostrarlo en el resto de las especies no estudiadas (ver tabla 1).

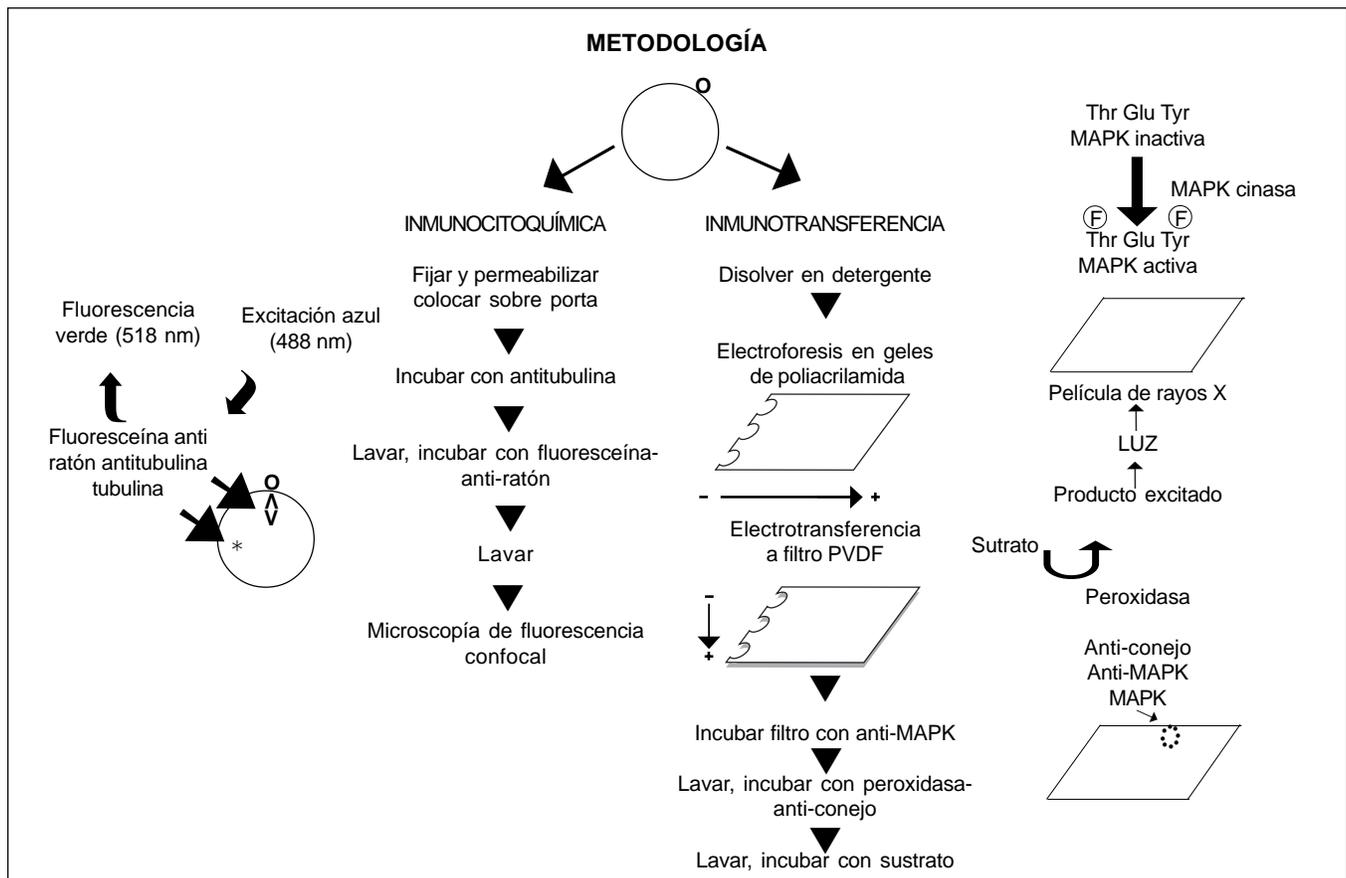
BIBLIOGRAFÍA

Gould, M. C. y J. L. Stephano. "MAP kinase, meiosis and sperm centrosome suppression in *Urechis caupo*". *Developmental Biology* 216, 1999. Pp. 348-358.

Stephano, J. L. y M. C. Gould. "Parthenogenesis in *Urechis caupo* (Echiura). I. Persistence of functional maternal asters following parthenogenesis without meiosis". *Developmental Biology* 167, 1995. Pp. 104-117.

---. "MAP kinase, a universal suppressor of sperm centrosomes during meiosis?" *Developmental Biology* 222, 2000. Pp. 420-428.

Wilson, E. B. "The Cell in Development and Heredity" 3a. ed. New York, Macmillan Co., 1928. Pp. 394-449.



ENZYME AND CHEMICAL DISAGGREGATION OF RABBIT *Zona pellucida* embryos

Héctor Serrano, Yolanda Gutiérrez Ramírez, Ismael Fuentes Mascorro, María Dolores García Suárez*

Desde hace varios años, una de las estrategias de Reproducción Asistida ha sido la optimización del número de crías o productos a partir de un solo embrión. Técnicas como la disección de embriones, la transferencia multivárica de embriones, la transferencia nuclear (conocida también como clonación) o simplemente la estimulación hormonal de los ovarios se han utilizado para este fin. Desgraciadamente estas metodologías son lentas y requieren ya sea de técnicos altamente especializados o de equipo sofisticado. Aquí reportamos una metodología simple que implica disolver la zona pelúcida y que puede ser aplicada aun a embriones cubiertos de mucina. Conejas hembra estimuladas con hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se aparearon con machos de fertilidad probada y se colectaron los embriones. Los aparatos reproductivos aislados se lavaron con solución salina de fosfatos (PBS). Los embriones colectados se colocaron aleatoriamente en alguno de los siguientes seis grupos: NaOH-medio TC199, medio TC199 alcalino, medio TC-199 recién adicionado con NaOH, tratamiento con tripsina, tratamiento con quimiotripsina o tratamiento con pronasa. El tratamiento con tripsina o quimiotripsina fue negativo, ya que no pueden disolver la capa de mucina alrededor del embrión sin afectar su viabilidad. El medio alcalino disuelve la capa de mucina al igual que el NaOH agregado justo antes de ponerlo en contacto con el embrión, aunque el primero afecta su viabilidad. Sólo la solución salina con NaOH es capaz de disolver las cubiertas del embrión sin afectar su viabilidad. Los blastómeros aislados pueden ser aislados por separación mecánica de sus uniones.

INTRODUCTION

The zona pellucida is the acellular coat surrounding the egg and preimplantation embryo. After fertilization, the fertilized egg liberates the content from the cortical granules during the cortical reaction. The discharge on the perivitelline space and activation of the proteases induces the zona reaction as an important vestment modification in order to avoid supernumerary spermatozoa to enter the egg in a permanent polyspermy blockade mechanism (Moller and Wassarman, 1989. Serrano *et al.*, 1993). Early embryo development occurs in the space delimited by the zona pellucida. Occasionally, the forces driven by the division of the blastomeres broke the zona and permit the development of identical twins (Edwards and Beard, 1999).

In economically important species, the implementation of assisted reproductive techniques sometimes has the limitation that only by superovulation, artificial insemination and embryo transfer, one genetically selected individual can increase its

offspring to more than one individual. One approach is embryo sectioning to obtain two halves embryo ready for embryo culture or transfer into a surrogate foster mother (Yang *et al.*, 1989). Beside this approach, cloning of somatic cells into an appropriate oocyte environment can lead to genetically identical offspring's, as has been demonstrated by Willmut *et al.* (1997) and several others thereafter.

In oligoaztenozoospermic humans, one approach to solve the infertility problem is to directly insert sperm into the perivitelline space by zona drilling. In this case, zona dissolution is done by protease treatment or by using diluted acidic solutions. Some authors have seen the egg activation after zona dissolution with acidic Tyrod solution indicating the undesirable activation of the oocyte.

In order to combine both increase in yielding of individuals after a single insemination and avoid of the abnormal activation of blastomere metabolism, we have studied the effect of some proteases and NaOH-alkalinized solutions on the dissolution of the coats that surround rabbit embryos.

* Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. Michoacán y Purísima, Apartado Postal 55-535, Mexico, D. F., 09340.

PALABRAS CLAVE: Embrión, zona pelúcida, blastómeros, tratamiento enzimático, embriones libres de zona pelúcida.

MATERIAL AND METHODS

Rabbit embryos were obtained at different times from Female adult NZW rabbits that were injected with 0.8 mg GnRH (Conceptal, Intervet, Mexico) prior to be caged with a probed fertility male. Female reproductive tracts were obtained after cervical dislocation sacrifice, washed with warm PBS (10 mM Phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.2) added with 4 mg/ml BSA (Fraction V, Sigma Chem. St. Louis, MO). Tubal fluid was collected in a petry dish, embryo collected with a hand operated micropipette and evaluated for quality and developmental status

Zona digestion was done by adding directly trypsin (GIBCO Life Sciences,), chymotrypsin (Sigma Chem. St. Louis, MO) or Type XIV protease (Pronase, Sigma Chem. St. Louis, MO) to the TC199 medium (GIBCO Life Sciences) and after gentle mixing, embryos were added. Coat dissolution was followed by phase contrast microscopy. After each treatment, cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Embryo were maintained at 37°C in a 5% CO₂ in air incubator at high humidity to avoid medium evaporation

Basic solutions were obtained by adding sterile 1M NaOH to the medium until pH 11 was reached. In one experiment, embryos were incubated in this medium whereas others were first incubated in pH7.0 medium and an equivalent amount of NaOH was added to the medium. In both cases, embryo vestment dissolution was followed as for the enzyme zona digestion.

All chemicals and plasticware were of the highest quality available. Animals were housed, handled and maintained according to International regulations.

RESULTS

From the three enzymes used, only trypsin does not dissolve neither the mucin coat nor the zona pellucida (fig. 1). This could be due to the very low capacity of trypsin to digest the mucin coat components. This coat actually protects the embryo from protease attack or bacterial contamination (Lagow *et al.*, 1999). From all treated embryos, all degenerate or show blastomere darkening. The most easily damaged status is from 8 through the morula status. Eight cell embryos initiate to degenerate at 20 min after enzyme incubation, morula becomes degenerate after 28 minutes in the enzyme-containing medium whereas 6 cell embryos could survive as long as two hours if proper conditions are maintained.

Chymotrypsin does dissolve partially the rabbit embryo covers, but also promotes degeneracy and embryo darkening. All embryos were freed from the mucin coat in less than two hours. Mucin dissolution has a two-component behavior. In 4 cell embryos, mucin clearance is rapid (less than 10 min); 6 cell embryos maintains their mucin coat for up to an hour as the 10 celled embryos does. Eight cell embryos maintain the mucin layer for more than one and a third hour period. Whereas in all

embryo zona pellucida initiates to dissolve, degeneracy arrives first in a two hour and 50 minute period before complete zona dissolution takes place.

The most efficient enzyme treatment is by using pronase. With this enzyme, all 32 embryo were freed from both the mucin coat and the zona pellucida. Complete mucin dissolution takes from 22 to 40 minutes with no correlation between time exposure and embryo stage. In less than one and a third hour time period, zona pellucida was completely removed from all embryos. Mainly, after both the mucin coat and the zona envelope were dissolved, blastomere survival was more than 50 % in all tested embryo stages suggesting a mild embryo damage.

By using basic NaOH solutions, embryo covers are easily removed in a lesser time than the enzyme treatment. When the culture medium is alkalized before the embryo, mucin and zona dissolution takes longer than when concentrated solutions are added to the embryo-containing medium. Embryo viability was not affected by the alkali treatment since trypan blue exclusion test does not show dead blastomeres after the short period treatment.

DISCUSSION

Zona dissolution is a more or less standardized technique now used in *in vitro* fertilization procedures. Some authors dissolve parts of the Zona pellucida by using acidified Tyrode solution in order to drill holes through the zona to permit capacitated spermatozoa to fertilize the egg. Unfortunately, this treatment also induces nuclear fragmentation or cleavage (Johnson *et al.*, 1990).

Alkalized solutions have also been used to dissolve the zona (Dunbar *et al.*, 1980) but the extreme pH needed has diminished their use. Berger and co-workers (1989) have used basic solutions to analyze the rate of sperm penetrating the zona at different times. In early embryonic stages, the physical resistance of the zona is believed to be greater than in the unfertilized egg, a phenomenon known as Zona hardening (Wassarman and Albertini, 1994; Yanagimachi, 1994). This phenomenon has been associated with both chemical modification of the zona proteins and the deposition of cortical granule material.

Hardened zona is more resistant not only to chemical but also to enzyme treatment, as has been shown by Drobnis and co-workers (1988). In the case of the rabbit embryo, an additional barrier is the mucin coat. This outer coat is made of glycosaminoglycans that protect the egg from proteases from bacteria due to its low protein content. In our case, the mucin coat was effectively removed by basic solutions. In the protease treatment, trypsin does not remove the mucin coat whereas chymotrypsin and pronase do dissolve this coat. There were also differences in the time needed to dissolve the zona, whereas the chemical approach is rapid and so do not damage the embryo, enzyme treatments are quite long

permitting not only the enzyme action but also diminishes the cell viability. We propose that for an effective embryo coat removal, one simple and very rapid approach is to use either alkalized culture medium or to add a base amount that could bring the medium to low pH.

Blastomere isolation can be made just after zona removal by hand or micromanipulator-guided devices. These approaches have to take care of to neutralize the harsh environment in which the blastomeres are collected. We are currently interested in the development of isolated blastomeres in culture medium.

REFERENCES

- Berger, T., Turner K.O, Meizel S., y Hedrick, J.L. "Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm". *Biol. Reprod.* 40.1989. Pp. 525-530.
- Drobnis, E. Z., Andrew, J. B., y Katz, D.F. "Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: Is zona hardening a mechanical phenomenon?" *J. Exp. Zool.* 245.1988. Pp. 206-219.
- Dunbar, B.S. Wardrip, N. y Hedrick, J. L. "Isolation, physicochemical properties and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. pellucida". *Biochemistry* 2.1980:356-365.
- Edwards, R.G. y Beard, H. K. "How identical would cloned children be? An understanding essential to the ethical debate". *Human Reprod.* 4.1999. Pp. 791-811.
- Johnson, M. H., Pickering, S. J., Braude, P.R., Vincent, C., y Cant, C. J. "Acid Tyrode's solution can stimulate parthenogenetic activation of human and mouse oocytes". *Fertil. Steril.* 53.1990. Pp. 266-270.
- Lagow, E., DeSouza, M. M., y Carson, D.D. "Mammalian reproductive tract mucins". *Human Reprod.* 5.1999: 280-292.
- Schmell, E.D., Gulyas, B.J. y Hedrick, J.L. "Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to polyspermy". En: J.F. Hartmann (ed.), *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Academic Press (New York): 1983. Pp 365-413.
- Serrano, H., Ortiz-Galicia, C.A. y Flores-Herrera, H. "Mouse oocytes liberates proteases and peroxidases after chemical activation". *Mol. Biol. Cell.* 5.1993:69a.
- Wassarman, P.M. y Albertini, D.F. The mammalian ovum. En: E. Knobil, JD Niels (eds.), *The Physiology of Reproduction*. Plenum Publ. Co. (New York).1994. Pp. 79-122.
- Wilmot, I., Schneike, A. E., McWhir, J. M., Kind, A. J. y Campbell, H. S. "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells". *Nature* 385, 1997. Pp. 810-813.
- Yanagimachi, R. "Mammalian fertilization". En: E. Knobil, JD Niels (eds.), *The Physiology of Reproduction*. Plenum Publ. Co. (New York).1994. Pp. 189-317.
- Yang, C. H., Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. 1989. "Morphology and fertilizability of zona-free hamster eggs separated in halves and quarters by centrifugation". *Biol. Reprod.* 41. Pp. 741-752.

LA IMPORTANCIA DE LOS ANTIOXIDANTES VEGETALES: COMPOSICIÓN QUÍMICA

Absorción, metabolismo y actividad biológica

Joaquín Rodrigo García,¹ Gaspar Ros Berrueto,² María Jesús Perriago Castón,³ Francisco Molinar Holguín,⁴
Fernando Plenge Tellechea⁵ e Isabel Martínez Valverde⁶

En la actualidad, la nutrición ocupa mayor relevancia como factor de bienestar y prevención de enfermedades para nuestra sociedad. Por ello cada vez existen más estudios sobre su beneficio en la prevención de enfermedades cardiovasculares y de tipo degenerativo como el cáncer. Este es el caso de sustancias pertenecientes a los compuestos fenólicos que se encuentran en productos vegetales y algunas bebidas como el vino, que tienen gran importancia en la prevención de este tipo de enfermedades. Estas sustancias deben de formar parte de la dieta como un componente habitual para mantener niveles plasmáticos constantes y así conseguir el efecto deseado. Diversas investigaciones llevadas a cabo en países mediterráneos, donde la alimentación es rica en verduras, frutas y vino, indican que la incidencia de estas enfermedades es más baja que en otros países con dietas más ricas en grasa y carbohidratos y que presentan incidencias superiores en infartos de miocardio. Dentro de los alimentos con más contenido en estas sustancias están las frutas del bosque (muy consumidas en países escandinavos), las cebollas, el té y las manzanas.

Estas últimas tienen especial importancia para nosotros, ya que Chihuahua es un importante productor.

El consumo regular de estas frutas representaría una mejora de la alimentación y por consiguiente una reducción potencial de riesgos a sufrir enfermedades cardiovasculares y de tipo degenerativo.

NATURALEZA QUÍMICA

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen uno de los grupos de sustancias más numerosos y extendidos por el reino vegetal (a excepción de las algas y los hongos) con más de ocho mil estructuras conocidas (Harborne, 1986). Los polifenoles pueden variar desde simples moléculas como los ácidos fenólicos hasta estructuras poliméricas como es el caso de los taninos (por encima de 30 mil daltons). Normalmente aparecen en forma conjugada con un azúcar. Estos azúcares pueden ser monosacáridos, disacáridos e incluso oligosacáridos. La glucosa es el azúcar que más frecuentemente aparece ligada, aunque la galactosa y otros azúcares también son comunes (Bravo, 1998).

Dentro de los polifenoles se encuentran los flavonoides

que son un grupo de sustancias de diversa estructura y características químicas y que aparecen de forma normal en frutas, vegetales, semillas, flores y frutos secos (nueces) formando parte de la dieta humana (Middleton y Kandaswami, 1993). Estos componentes presentan bajo peso molecular y su estructura principal aparece gráficamente en la figura 1. Esta consiste en dos anillos aromáticos unidos a través de

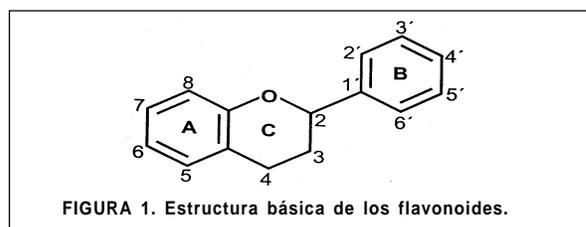


FIGURA 1. Estructura básica de los flavonoides.

¹ Doctor en Nutrición y Bromatología. Profesor-investigador del Centro de Estudios Biológicos, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

² Doctor en Nutrición y Bromatología. Catedrático de la Universidad de Murcia, España.

³ Doctora en Nutrición y Bromatología. Profesora titular de la Universidad de Murcia, España.

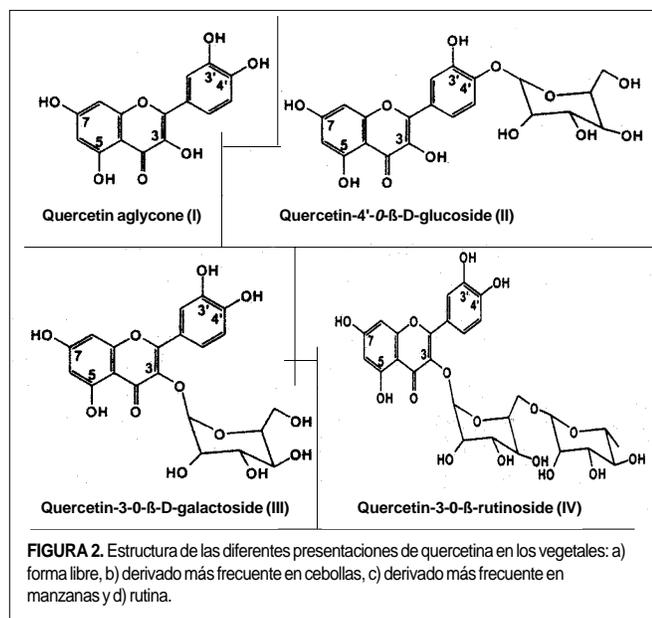
⁴ Doctor en filosofía. Profesor-investigador del Departamento de Ciencias Básicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

⁵ Doctor en Bioquímica. Profesor-investigador del Departamento de Ciencias Básicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

⁶ Becaria de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia, España.

tres carbonos que normalmente forman un anillo heterocíclico oxigenado. Los flavonoides pueden aparecer ocasionalmente en las plantas en su forma libre sin unión a azúcares, pero lo más frecuente es encontrarlos en su forma glucoderivada.

La quercetina es la más común de las moléculas glucosiladas y ha sido objeto de numerosos estudios por ser el flavonoide predominante en la dieta. Estas estructuras son hidrolizadas en el intestino por la flora microbiana para producir la estructura libre del azúcar y biológicamente activa. En la siguiente figura podemos observar diferentes estructuras de presentación de esta molécula en los vegetales.



PRESENCIA EN ALIMENTOS Y BEBIDAS

La presencia de estos componentes está ampliamente distribuida en cereales, vegetales, frutas, legumbres, semillas y frutos secos. También aparecen en bebidas tales como el té, café, cerveza y vinos. Los polifenoles son parcialmente responsables de las características nutricionales y sensoriales de vegetales, tales como la astringencia y el sabor amargo. Además, su presencia en alimentos de origen vegetal es muy importante debido a su efecto antioxidante sobre los lípidos y protege del deterioro de los alimentos, su seguridad, color, aroma y textura (Kinsella *et al.*, 1993; Noguchi *et al.*, 1994).

Varios autores han observado que la coloración de los diferentes tipos de productos vegetales puede influenciar la actividad antioxidante de los mismos. Así, los extractos de pimiento amarillo y rojo, la col roja y las cebollas rojas presentan mayores actividades antioxidantes que las encontradas en los cultivos verdes y blancos. La diferencia en sus capacidades antioxidantes puede ser debida a los pigmentos. Los pimientos amarillos y rojos poseen flavonoides (quercetina) y carotenoides (capsantina) (Mínguez-Mosquera y Hornero-

Méndez, 1994; Lee *et al.*, 1995). La col roja posee antocianinas (Nakatani *et al.*, 1987; Ikeda *et al.*, 1987) y las cebollas rojas contienen flavonoides —quercetina y Kaempferol— (Bilyk *et al.*, 1984) y antocianinas (Fuleki, 1971). Se conoce que los flavonoides poseen una alta capacidad antioxidante (Lee *et al.*, 1995), pero según los estudios de Furuta *et al.* (1997) no existen evidencias definitivas de que este pigmento posea la mejor actividad antioxidante. Los diferentes pigmentos pueden presentar actividad antioxidante aislada o bien mostrar una acción sinergista entre ellos.

La formación de fenoles y derivados fenólicos glicosilados está muy ligada a la presencia de luz, por lo que las mayores concentraciones se encuentran en las zonas más externas de los vegetales o frutas.

Las manzanas y los cítricos son ricos en ácidos fenólicos y flavonoides y las mayores concentraciones de componentes fenólicos aparecen en la piel de las frutas (Bagchi, 1999).

La presencia de polifenoles en cereales secos es menor del 1%, mientras que su contenido en legumbres de variedades pardas tales como las del tipo “riñón rojo” o alubias negras es considerablemente mayor. Los frutos secos por su parte son ricos en taninos y el aceite de semillas también posee ácidos fenólicos.

La catepsina y proantocianidinas aparecen en las porciones lignificadas de los racimos de las uvas.

El aceite de olivo contiene ambos componentes, ácidos fenólicos y taninos hidrolizables. Finalmente el contenido de polifenoles en los zumos de frutas fluctúa en un intervalo de 5-500 mg/ml. En particular el té verde contiene una cantidad significativa de derivados de la catepsina, mientras que el té negro contiene grandes cantidades de polifenoles oxidados tales como las teaflavinas y tearubiginas. Por su parte los granos de café contienen ácido clorogénico.

En general y según datos de la bibliografía científica, unas de las fuentes principales de flavonoides para la dieta son en orden decreciente el té, las cebollas y las manzanas (Hertog *et al.*, 1993a; Hertog *et al.*, 1993b; Knekt *et al.*, 1996; Knekt *et al.*, 1997).

Con relación a las principales fuentes de antioxidantes en la dieta, debemos tener en cuenta que México destina el 5.8 por ciento de su superficie agrícola a las producciones frutales y que el 65 por ciento de la producción nacional de frutas se localiza en los estados de Michoacán, Veracruz, Sonora, Oaxaca, Chihuahua y Chiapas.

La producción de manzana (una de las fuentes destacadas de flavonoides en la dieta) y de durazno es especialmente importante en el estado de Chihuahua. La superficie de cultivo de manzana se ha mantenido más o menos estable desde 1985 (52,000 hc) con ligeros incrementos desde 1988. Además, la producción de manzana en miles de toneladas en 1992 fue el séptimo cultivo más importante con una producción total de 598 mil toneladas. Debemos de tener en cuenta que con sólo un 5.8 por ciento de la superficie total de cultivo, la manzana representa un valor del 18.5 por ciento del PIB. Este

valor es cercano al obtenido con los cereales (26.6 por ciento), el cual representa un 46 por ciento de la superficie total de cultivo (INEGI, 1994).

Finalmente, también debemos tener en cuenta que este tipo de sustancias se encuentran no sólo en frutas y verduras sino también en los vinos tintos.

El efecto del vino ha sido observado en estudios epidemiológicos en los cuales aparecía baja incidencia de enfermedades cardíacas en ciertas regiones de Francia y que han sido descritos como la “paradoja francesa” (Renaud y Logeril, 1992). Estos hábitos de consumo de vino en la dieta diaria forman parte de la “dieta mediterránea”, que se caracteriza por el consumo de grandes cantidades de vegetales, y por lo tanto de una dieta con baja concentración de grasas, y con el aporte del vino como complemento diario. Este régimen alimenticio ha sido asociado con una baja tasa de incidencia de enfermedades coronarias en contraste con las dietas más al oeste del Mediterráneo (Formica y Regelson, 1995).

ABSORCIÓN Y METABOLISMO

A pesar de los efectos significativos de los flavonoides sobre las enfermedades cardíacas (De Whalley *et al.*, 1990) la información que existe sobre la absorción, metabolismo y excreción de cada uno de los flavonoides, es escasa. Algunos estudios consideran que son absorbidos tras una administración oral (Das, 1971), otros defienden que son pobremente absorbidos y que no llegan a la circulación general de forma medible (Gugler *et al.*, 1975). Pero estos estudios llevados a cabo han tomado las dosis de estas sustancias como una dosis única farmacológica más que como una ingesta diaria incluida en la dieta (Hertog *et al.*, 1993) por lo que la extrapolación de estos datos no es apropiada para explicar la absorción y metabolismo del aporte de flavonoides en la dieta diaria.

Los flavonoides están presentes en los alimentos como complejos ligados a azúcares que son llamados glucósidos en general o más específicamente glucósidos (para glucosa) rutinósidos (para rutina) etc., dependiendo de la variedad del azúcar.

El enlace del azúcar con el flavonoide es un enlace b-glucosídico el cual es resistente a la acción de las enzimas pancreáticas. Por ello se pensaba que los glucósidos no podían ser absorbidos.

Sin embargo, cuando es medida la quercetina fecal en individuos ileostomizados, se encuentra que la absorción humana de quercetina b-glucósido procedente de las cebollas (ligada a la glucosa) es de un 52 por ciento, mientras que la quercetina sin azúcar, las llamadas agliconas y la quercetina b-rutinosidos (ligada a la rutinosa) fueron absorbidas sólo en un 20 por ciento. Por ello estos datos sugieren que el residuo de glucosa favorece su absorción a nivel intestinal (Hollman *et al.*, 1997).

Además, los picos de concentración fueron detectados en

plasma en menos de 0.7 horas tras la ingestión de cebollas y para las manzanas tras 2.5 horas y para la forma rutinósida tras 9 h. La vida media en sangre fue de 28 horas para las ingestas procedentes de la cebolla y 23 para las manzanas.

El corto tiempo de absorción de los derivados de la glucosa sugiere que la absorción ya comienza en el estómago y después en el intestino delgado, mientras que en los demás casos la absorción tenga lugar a nivel del colon (Hollman *et al.*, 1997).

Estos estudios realizados sobre biodisponibilidad fueron conducidos desde el punto de vista de una dosis o ingesta diaria repartida durante toda la dieta y no como una única dosis. En dichos ensayos se utilizaron nueve individuos, cinco mujeres y cuatro hombres de una edad comprendida entre 20 y 47 años y se suplementó su alimentación por un período de cinco días con diferentes tipos de quercetina: la conjugada con glucosa, presente mayoritariamente en cebollas, con manzanas que contienen derivados con glucosa y con otros azúcares y otro grupo con quercetina ligada a la rutinosa que es el derivado que mayormente aparece en el té.

En cuanto a la influencia de los polifenoles en la digestibilidad de los macronutrientes, se conoce que interfieren en la absorción de las proteínas ya que se unen a ellas y las precipitan. Aunque esta capacidad de unión a las proteínas es común a los polifenoles debido al alto grado de hidroxilación, los fenoles de bajo peso molecular (como es el caso de los flavonoides) son incapaces de precipitar las proteínas. Los taninos altamente polimerizados son los más efectivos en la precipitación de proteínas (Lee *et al.*, 1995). En cuanto a los minerales, también pueden interferir en su absorción ya que pueden formar complejos con determinados minerales, en especial con cationes metálicos tales como el hierro (Hurrell *et al.*, 1998).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Estos compuestos han sido descritos como sustancias con un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo efectos antibacterianos, antivíricos (Hanasaki *et al.*, 1994), antiinflamatorios y antialérgicos (Middleton y Kandaswami, 1993; Hanasaki *et al.*, 1994; Hope *et al.*, 1983) y efectos vasodilatadores (Duarte *et al.*, 1993). Además este tipo de sustancias inhibe la peroxidación lipídica (Ratty y Das., 1988; Salvayre *et al.*, 1988), la agregación plaquetaria (Gryglewski *et al.*, 1987; Tzeng *et al.*, 1991; Robak *et al.*, 1988), permeabilidad y fragilidad capilar (Torel *et al.*, 1986; Budavari *et al.*, 1989) y la actividad enzimática de sistemas como el de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa (Middleton y Kandaswami, 1993; Hope *et al.*, 1983; Robak *et al.*, 1988; Hodnick *et al.*, 1988). Los flavonoides presentan estos efectos como antioxidantes, protectores frente a radicales libres (Hanasaki *et al.*, 1994; Pignol *et al.*, 1988; Cavallini *et al.*, 1978) y quelantes de cationes divalentes (Afanas'ev *et al.*, 1989). Por ello, su capacidad antioxidante previene la formación del complejo LDL oxidado que está asociado con el envejecimiento celular y enfermeda-

des crónicas tales como la arteriosclerosis (Mora *et al.*, 1990; Rankin *et al.*, 1993).

Los ácidos grasos poliinsaturados que aparecen en las membranas celulares son oxidados por vía enzimática o por procesos autooxidativos y por las reacciones en cadena de los radicales libres (Torel *et al.*, 1986). Un exceso de radicales libres puede provocar una reacción en cadena descontrolada de lipoxidación (Kaul *et al.*, 1993) traduciéndose en un estado patológico que puede inducir a arteriosclerosis y cáncer (Mora *et al.*, 1990).

El proceso de lipoxidación comprende tres fases: 1) la de iniciación, donde se capta un hidrógeno desde los ácidos grasos y se forman los radicales del lípido, 2) la de propagación, en donde el radical lípido reacciona con el oxígeno molecular para formar el radical peroxi del lípido, el cual se rompe generando más radicales que reaccionarían a su vez formando una cadena 3) la de terminación, en la que los radicales libres reaccionan entre sí o con antioxidantes para formar productos inertes (Torel *et al.*, 1986; Coultate, 1990; Niki, 1987).

Por ello los antioxidantes tienen la función protectora frente a los radicales libres, ya que bien inhibirían la fase de iniciación o bien acelerarían la fase de terminación. Los flavonoides actuarían donando hidrógenos (figura 3) al radical peroxi de los lípidos formándose un radical flavonoide y terminándose la reacción en cadena (Torel *et al.*, 1986; Robak y Gryglewski, 1988). También este tipo de sustancias antioxidantes actúan inhibiendo la reacción de Fenton y Haber-Weiss que es una fuente importante de radicales libres.

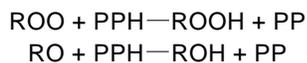


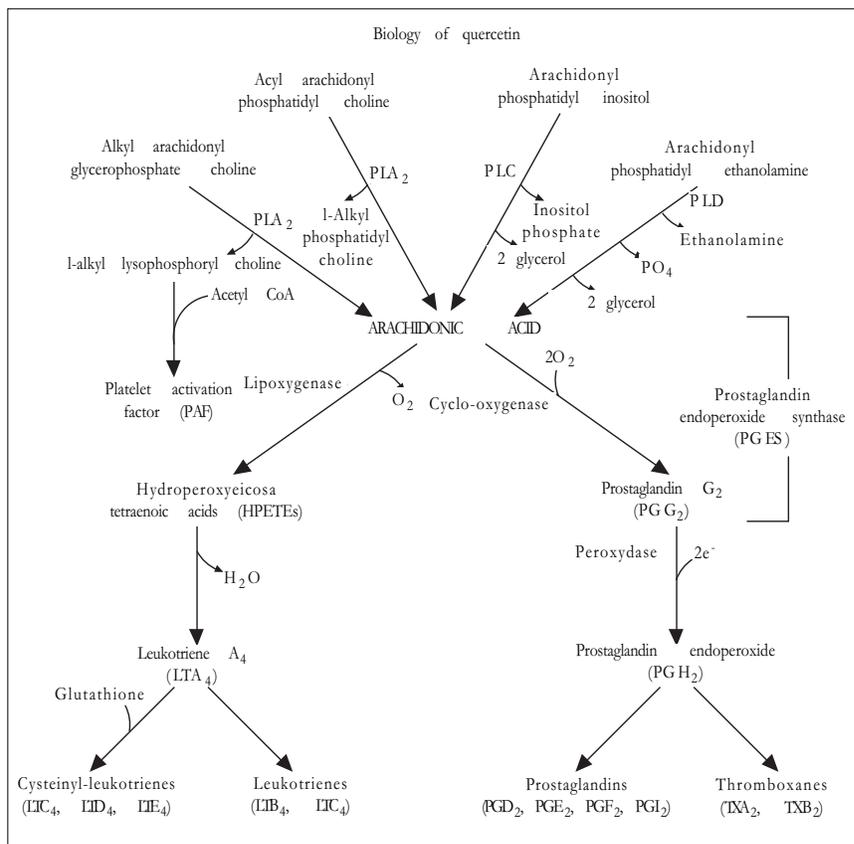
FIGURA 3. Reacción de donación de hidrógenos de los polifenoles.

Además, otra forma en la que los flavonoides protegen nuestro organismo es mediante la prevención de la aparición de moléculas LDL-oxidadas. La aparición de LDL-colesterol alto en plasma está asociado con la aparición acelerada de arteriosclerosis (Steinberg *et al.*, 1989). Las lesiones ateromatosas se desarrollan en el espacio subendotelial debido a la acumulación de esteres de colesterol en macrófagos (células espumosas).

Hasta hace poco el mecanismo de formación de las células espumosas no estaba muy claro, ya que los macrófagos poseen pocos receptores para la LDL y paradójicamente estos receptores son disminuidos cuando las concentraciones plasmáticas de LDL se ven aumentadas (Goldstein y Brown, 1983).

Goldstein *et al.* (1979) fueron los primeros en demostrar in vitro que la LDL modificada químicamente es reconocida por receptores específicos en los macrófagos. Por ello, las LDL modificadas son fagocitadas con mayor facilidad y rapidez que la molécula nativa de LDL cargándose los macrófagos de colesterol y formándose las células espumosas y las placas ateromatosas (Kodama *et al.*, 1990).

Por otro lado, la presencia de flavonoides tiene un efecto inhibitorio en la agregación plaquetaria (Hollman *et al.*, 1997; Bagchi, 1999), el cual está directamente relacionado con la formación de trombos y la arteriosclerosis (Mora *et al.*, 1990; Tzeng *et al.*, 1991). Sin embargo la acción de los flavonoides en la inhibición de la agregación plaquetaria no es debida a un solo mecanismo bioquímico, sino que posee diferentes rutas metabólicas (Tzeng *et al.*, 1991; Elliott *et al.*, 1992) como es la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico dentro de las plaquetas. También presentan un antagonismo en la formación del tromboxano y en sus receptores (Tzeng *et al.*, 1991). Uno de los mecanismos más importantes en la inhibición de la agregación plaquetaria es incrementando la concentración de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) bien por estimulación de la adenilato ciclasa o bien por la inhibición de la AMPC fosfodiesterasa (Duarte *et al.*, 1993; Kuppasamy y Das, 1992).



Generación y disposición del ácido araquidónico (Formica y Regelson, 1995)

EPIDEMIOLOGÍA

El único estudio epidemiológico publicado que examina la relación entre la ingesta diaria de flavonoides en la dieta y las enfermedades coronarias es el estudio Zutphen Elderly, en el cual se valoró la ingesta de flavonoides de 805 hombres con una edad comprendida entre 65 a 84 años. Se observó que una ingesta de 19 mg/día de flavonoides estaba asociada con una mortalidad por enfermedades coronarias de 18.5 por mil personas y año, mientras que una ingesta de 30 mg/día estaba asociada a una mortalidad de un 7.8 (Hertog *et al.*, 1993). Por tanto se encontró una relación inversa entre la ingesta de flavonoides y las enfermedades coronarias y también aunque más débil, una disminución de la incidencia de infartos de miocardio. La ingesta media de esta población fue de unos 26 mg/día y los alimentos que mayores contribuciones realizaron a la dieta fueron el té con un 61 por ciento, las cebollas con un 13 por ciento y las manzanas con un 10 por ciento.

Diferentes autores realizaron estudios sobre el efecto beneficioso de la ingesta de manzanas sobre la salud debido a la presencia de este tipo de sustancias, en concreto la quercetina. Los resultados obtenidos indicaban que los componentes antioxidantes presentes en los extractos de frutas disminuían hasta un 38 por ciento la oxidación de la LDL (Pearson *et al.*, 1999; Paganga *et al.*, 1999). Justesen *et al.*, (1998) muestran datos similares realizados con la población holandesa y en Finlandia de la Edad Media. En dicho estudio, de nuevo se resalta la importancia de las manzanas en la dieta por su aporte en quercetina. Es pues importante la realización de un estudio en la población mexicana y observar dentro de nuestra dieta cuáles son los alimentos que potencialmente pueden elevar o aportar las mayores cantidades de antioxidantes.

TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, ha traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación. Las primeras técnicas desarrolladas fueron espectrofotométricas, que si bien tienen interés desde el punto de vista del control de calidad, no aportan la suficiente información desde el punto de vista nutricional. Por ello ha sido necesario recurrir a técnicas más precisas, como las cromatográficas que permiten la identificación individualizada de cada uno de los polifenoles de interés nutricional.

Ensayos ultravioleta

Un gran número de estudios se han realizado para desarrollar técnicas rápidas de cuantificación de compuestos fenólicos mediante ensayos ultravioletas. Cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbancias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta (Shahidi y Naczki, 1995). Así, los fenoles simples tienen una absorbancia máxima entre 220 y 280 nm (Owades *et al.*, 1958), mientras que los compuestos fenólicos más complejos presentan una amplia variación en la longitud de onda a la cual presentan la absorbancia máxima. Una de las técnicas más empleadas dentro de este grupo es la determinación del ácido clorogénico, el cual es cuantificado tras su extracción con alcohol etílico y posterior lectura de la absorbancia máxima a una longitud de onda de 325-328 nm (Dao y Friedman, 1992).

Técnicas cromatográficas

Se han desarrollado diferentes técnicas cromatográficas para la separación, aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos. Sin embargo, las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son las más empleadas actualmente para la separación y cuantificación de mezclas complejas de compuestos fenólicos. Existen varios soportes y fases móviles que permiten el análisis de antocianidinas, proantocianidinas, flavonas y ácidos fenólicos.

El desarrollo de la fase reversa ha mejorado significativamente la separación por HPLC de diferentes clases de compuestos fenólicos (Hostettman y Hostettman, 1982). Igualmente, la utilización del detector de foto-diodo array facilita la detección de estos compuestos por HPLC, al utilizar de forma conjunta para la identificación de los picos el tiempo de retención y el espectro ultravioleta (Bartolomé *et al.*, 1993). Así, mediante la utilización de HPLC podemos determinar un gran número de polifenoles de interés nutricional, como fenoles simples, ácidos fenólicos y sus derivados, y los distintos flavonoides, aunque esta técnica requiere la utilización de método de extracción optimizados a cada uno de los compuestos que se vayan a analizar (Shahidi y Naczki, 1995).

Esta técnica cromatográfica ha sido utilizada por diferentes autores (Li *et al.*, 1993; Justesen *et al.*, 1998) para el estudio y cuantificación de compuestos fenólicos en manzanas con una sensibilidad de detección de hasta 0.02 mg/kg y empleando diferentes métodos de detección, ultravioleta visible o foto diodo array. La técnica consiste en una extracción mediante metanol y etil acetato de los extractos de frutas y posteriormente una separación con una columna C18 de fase reversa. Se obtiene una resolución mayor de 1.23 en todos los compuestos estudiados y la correlación obtenida para los estándares está entre $r = 0.983$ y 1. El tiempo medio de cada análisis es de unos 30 minutos.

BIBLIOGRAFÍA

- Afanas'ev, I. B., Dorozhko, A. I., Brosdkii, A. V., Kostyuk, V. A. y Potapovich, A. I. "Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation". *Biochem. Pharmacol.*, 38, 1989. Pp. 1763-1769.
- Bagchi, D. "Bioflavonoids and polyphenols in human health and disease prevention". *Nutrition & the M. D.* 25, (5), 1999. Pp 1-3.
- Bartolomé, B., Bengoechea, M. L., Gálvez, M. C., Pérez-Illzarbe, F. J., Hernández, T., Estrella, I. y Gómez-Cordovés, C. *Photo-diode array detection for elucidation of the structure of phenolic compounds*. *J. Chromatogr. A*, 655, 1993. Pp. 119-125.
- Bravo, L. "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance". *Nutrition Reviews*, 56, 1998. Pp. 317-333.
- Bilyk, A., Cooper, P. L. y Sapers, G. M. "Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) tissue". *J. Agric. Food Chem.* 32, 1984. Pp. 274-276.
- Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A. y Heckelman, P. E. (eds). *The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 11 th ed, Merck&Co., Inc., USA, 1989.
- Cavallini, L., Bindoli, A. y Siliprandi, N. "Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and others flavonoids". *Pharmacol. Res. Commun.*, 10, 1978. Pp. 133-136.
- Coulter, T. P. *Food: The chemistry of its components*. 2nd ed. The Royal Society of Chemistry, 1990. Pp. 137-149.
- Dao, L. y Friedman, M. "Chlorogenic acid contents of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry". *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1992. Pp. 2152-2156.
- Das, N. P. "Studies on flavonoid metabolism: Absorption and metabolism of (+) - catechin in man". *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1971. Pp. 3435-3445.
- De Whalley, C. V., Rankin, S. M., Houlst, J. R. S., Jessup, W. y Leake, D. S. "Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages". *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1990. Pp. 1743-1750.
- Duarte, J., Vizcaino, F. P., Utrilla, P., Jimenez, J., Tamargo, J. y Zarzuelo, A. "Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure activity relationships". *Biochem. Pharmacol.*, 24, 1993. Pp. 857-862.
- Elliott, A. J., Scheiber, S. A., Thomas, C. y Pardini, R. S. "Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study". *Biochem. Pharmacol.*, 44, 1992. Pp. 1603-1608.
- Formica, J. V. y Regelson, W. "Review of the biology of the quercetin and related bioflavonoids". *Fd Chem. Toxic.*, 33, 1995. Pp. 1061-1080.
- Fuleki, T. "Anthocyanins in red onion (*Allium cepa* L.)". *J. Food Sci.* 36, 1971. Pp. 101-104.
- Furuta, S., Nishiba, Y. y Suda I. "Fluorometric assay for screening antioxidative activity of vegetables". *J. Food Sci.* 62, (3), 1997. Pp. 526-528.
- Goldstein, J. L. y Brown, M. S. "Lipid metabolism in the macrophage". *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 1983. Pp. 223-262.
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. y Brown, M. S. "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1979. Pp. 333-337.
- Gryglewski, R. J., Korbut, R., Robak, J. y Swies, J. "On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids". *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1987. Pp. 317-322.
- Gugler, R., Leschik, M. y Dengler, H. J. "Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses". *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 9, 1975. Pp. 229-234.
- Hagerman, A. E. "Tannin-protein interaction". En: *Phenolic compounds in food and their effects on health, I: analysis, occurrence, and chemistry*. Pp 236-246. Ho CT, Lee CY, Huang MT Eds. ACS Symposium series 506. Washington: American Chemical Society.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S. y Fukui, S. 1994. "The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids". *Free Radical Biol. Med.*, 16, pp 845-850.
- Harbone, J.B. "Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships". Alan R. Liss, New York, USA, 1986, Pp. 15-24.
- Hertog, M.G., Hollman, P.C., Katan, M.B. y Kromhout, D. "Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands". *Nutr. Cancer*, 20, (1), 1993a. Pp. 21-29.
- Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B. y Kromhout, D. "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study". *Lancet*, 342, (8878), 1993b. Pp. 1007-1011.
- Hollman, P. C., Van Trijp, J. M., Buysman, M. N., Van der Gaag, M. S., Mengelers, M. J., De Vries, J. H. y Katan, M. B. 1997. "Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man". *FEBS Lett.*, 418, (1-2). Pp 152-156.

- Hodnick, W. F., Milosavljevic, E. B., Nelson, J. H. y Pardini, R. S. "Electrochemistry of flavonoids: Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration and production of oxygen radicals by flavonoids". *Biochem. Pharmacol.*, 37, 1988. Pp. 2607-2611.
- Hope, W.C., Welton, A.F., Fielder-Nagy, C., Batula-Bernardo, C. y Coffey, J.W. "In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (srs-a) and lipoxygenase activity of quercetin". *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1983. Pp. 367-371.
- Hostettmann, K. Y Hostettmann, M. "Isolation techniques for flavonoids. In: Harborne, J.E. y Mabry, T.J., Eds. Chapman and Hall, The flavonoids: advances in research". London and New York, chap. 1, 1982.
- Ikedo, K., Kikuzaki, H., Nakamura, M. y Nakatani, N. "Structure of two acylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea*)". *Chemistry Express* 2, 1987. Pp. 563-566.
- INEGI. (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 1994.
- Jacobs, R.A. "The integrated antioxidant system". *Nutr. Res.* 15, (5), 1995. Pp. 755-766.
- Justesen, U., Knuthsen, P. y Leth, T. "Quantitative analysis of flavonols, flavonols and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high performance liquid chromatography with photo diode array and mass spectrometric detection". *J. Chromatogr. A.*, 799, (1-2), 1998. Pp. 101-110.
- Kaul, N., Siveski-Lliscovic, N., Hill, M., Slezak, J. y Singal, P. K. "Free radicals and the heart. J. Pharmacol". *Toxicol. Meth.*, 30, 1993. Pp. 55-67.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A. y Maatela, J. "Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study". *BMJ*, 312, (7029), 1996. Pp. 478-481.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Hellevaara, M., Teppo, L., Pukkala, E. y Aromaa, A. "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms". *Am. J. Epidemiol.* 146, (3), 1997. Pp 223-230.
- Kinsella, J. E., Frankel, E., Granit, R., German, B. y Kanner, J. "Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plants foods". *Food Technol.* 47, (4), 1993. Pp. 85-89.
- Kuppusamy, U. R. y Das, N. P. "Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes". *Biochem. Pharmacol.*, 44, 1992. Pp. 1307-1315.
- Lee, Y, Howard, L. R. y Villalon, B. "Flavonoids and antioxidants activity of fresh pepper (*Capsicum annum*) cultivars". *J. Food Sci.* 60, 1995. Pp. 473-476.
- Li, P., Wang, X. Q., Wang, H. Z. y Wu, Y. N. "High performance liquid chromatographic determination of phenolic acids in fruits and vegetables". *Biomed. Environ. Sci.*, 6, (4), 1993. Pp. 389-398.
- Mora, A., Paya, M., Rios, J. L. y Alcaraz, M. J. "Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and others flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation". *Biochem. Pharmacol.*, 40, 1990. Pp. 793-797.
- Middlenton, E. Jr. y Kandaswami, C. "The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer". En: *The flavonoids: Advances in research since 1986*. J. B. Harborne, ed., Chapman y Hall, London, UK, 1993. Pp. 619-652.
- Minguez-Mosquera, M. I. y Hornero-Mendez, D. "Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annum* Cv Bola and Agridulce". *J. Agric. Food Chem.* 42, 1994. Pp. 38-44.
- Nakatani, N., Ikeda, K., Nakamura, M. y Kikuzaki, H. "Structure of diacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea*)". *Chemistry Express* 2, 1987. Pp. 555-558.
- Niki, E. "Antioxidants in relation to lipid peroxidation". *Chem. Phys. Lipids.*, 44, 1987. Pp. 227-253.
- Noguchi, N., Komuro, E., Niki, E. y Wilson, R. L. "Action of curcumin as an antioxidant against lipid peroxidation". *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 43, (12), 1994. Pp. 1045-1051.
- Owades, J. L., Rubin, G. Y Brenner, M. W. "Determination of foods tanins by ultraviolet spectrophotometry". *J. Agric. Food Chem.*, 6, 1958. Pp. 44-48.
- Paganga, G., Miller, N. y Rice-Evans, C.A. "The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?" *Free Radic. Res.*, 30, (2), 1999. Pp. 153-162.
- Pearson, D.A., Tan, C.H., German, J.B., Davis, P.A. y Gershwin, M.E. "Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation". *Life Sci.*, 64, (21), 1999. Pp. 1913-1920.
- Pignol, B., Etienne, A., Crastes de Paulet, A., Deby, C., "Mencia-Huerta, J.M. y Braquet, P. 1988. Role of flavonoids in the oxygen-free radical modulation of the immune response. En: *Plants Flavonoids in Biology and Medicine II*". *Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. Alan R. Liss, New York, NY, USA. Pp. 173-182.
- Rankin, S. M., De Whalley, C. V., Houlst, J. R. S, Jessup, W., Wilkins, G. M., Collard, J. y Leake, D.S. "The modification of low density lipoprotein by the flavonoids mirycetin and gossypetin". *Bioche. Pharmacol.*, 45, 1993. Pp. 67-75.

- Ratty, A. K. y Das, N. P. "Effects of flavonoids on non-enzymic lipid peroxidation: Structure activity relationships". *Biochem. Med. Metabol. Biol.*, 39, 1988. Pp. 69-79.
- Renaud, S. y de Logeril, M. "Wine, alcohol, platelets and the Frech paradox for coronary heart disease". *Lancet*, 339, 1992. Pp. 1523-1526.
- Robak, J., Korbut, R., Shridi, F., Swies, J. y Rzakowska-Bodalska, H. "On the mechanism of antiaggregatory effect of myricetin". *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 40, 1988. Pp. 337-340.
- Robak, J. y Gryglewski, R. J. "Flavonoids are scavengers of superoxide anions". *Biochem. Pharmacol.*, 37, 1988. Pp. 837-841.
- Salvayre, R., Negre, A., Affany, A., Lenoble, M. y Douste-Blazy, L. "Protective effect of plants flavonoids, analog and vitamin E against lipid peroxidation of membranes. En: Plants flavonoids in biology and medicine II". *Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. Alan R. Liss, New York, NY, USA, 1988. Pp. 313-316.
- Shahidi, F. y Naczk, M. *Foods phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application*. Tecnnomic, Publishing CO., INC eds. Lancaster, Pennsylvania, USA, 1995.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. y Witztum, J. L. "Beyond cholesterol: Modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity". *New Engl. J. Med.*, 320, 1989. Pp. 915-924.
- Torel, J., Cillard, J. y Cillard, P. "Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical". *Phytochemistry* 25, 1986. Pp. 383-385.
- Tzeng, S.H., Ko, W.-C., Ko, F.-N. y Teng, C.-M. 1991. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb. Res.*, 64, pp 91-100.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme realizar tantas cosas que me gustan en mi trabajo, por permitirme ilusionarme y disfrutar de la vida.

También a mi familia que siempre me ha apoyado en todo cuanto he querido hacer.

A mis amigos de la Universidad de Murcia y especialmente a mis directores de tesis Gaspar y María Jesús, gracias por ayudar a formarme en este mundo de la ciencia.

A la UACJ por darme la oportunidad de desarrollar mi trabajo dentro de su seno y a mis compañeros de trabajo por su apoyo cuando lo he necesitado y por saber aguantarme en mis días malos.

Finalmente a mi reciente esposa Dennise, por ser el motor de ilusión en todo momento... ¡gracias!

Joaquín Rodrigo García

LA FLUIDEZ MEMBRANAL EN ERITROCITOS DE

Niños severamente desnutridos

Carolina Campos Muñiz,¹ Pablo Rangel Silva,² Miguel Ramos Motilla³ y José Luis Gómez Olivares^a

El propósito del presente estudio fue investigar los cambios en la fluidez membranar en los eritrocitos de niños con desnutrición energética proteica severa (DCPS). La fluidez membranar (determinada por polarización de la fluorescencia) mostró una disminución por un aumento en la relación colesterol-fosfolípidos. En este estudio se sugiere que la desnutrición severa tiene un efecto profundo sobre la dinámica y composición lipídica en las membranas de los eritrocitos, que podrían alterar sus funciones celulares.

INTRODUCCIÓN

Al iniciar este nuevo milenio, una población cercana a los 800 millones de personas padecen algún tipo de desnutrición, de los cuales 200 millones corresponden a niños que presentan un peso corporal por debajo del esperado para su edad, y alrededor de 70 millones presentan síntomas de desnutrición energética proteica severa (DCPS) (Iyengar y Nair, 2000).

Esta enfermedad se produce como consecuencia de una deficiente ingestión y/o utilización de dietas con bajo contenido proteico. Es durante la edad temprana cuando la DCPS produce sus efectos más profundos y devastadores, debido a las elevadas necesidades en nutrientes para el intenso crecimiento corporal (Cravioto, J. y Arrieta, R. 1985).

En nuestro país, la desnutrición energética proteica severa tiene una elevada incidencia en zonas suburbanas y rurales. Recientemente, en el estado de Chihuahua, Monárrez y Martínez (2000) determinaron que en la población tarahumara este síndrome tiene una elevada prevalencia entre los niños menores de cinco años, siendo predominante en los de dos años de edad.

La deficiencia energética proteica severa produce alteraciones estructurales y funcionales sobre las membranas celulares de diversos tejidos (Krishnaswamy, 1989). En los eritrocitos de niños que padecen DCPS tipo kwashiorkor, se ha informado un aumento en la resistencia a la lisis osmótica, y en la actividad enzimática implicada en el mantenimiento de la tonicidad celular (Kaplay, 1978).

El flujo de iones tiene un papel primordial en el metabolismo, que puede aumentar o disminuir en respuesta al suministro de nutrientes (Kaplay, 1978). El transporte a través de la membrana plasmática depende del funcionamiento óptimo de las enzimas que en ella se encuentran embebidas, en el que el microambiente lipídico circundante puede tener un papel importante. En niños que sufren DCPS, se han descrito cambios en la composición de los fosfolípidos, y se ha informado la existencia de diferencias entre las membranas procedentes de niños con deficiencia nutricional tipo kwashiorkor y marasmo (Cuevas-Covarrubias, *et al.*, 1994).

Teniendo en cuenta que la desnutrición severa es un síndrome que impide a los niños en edad temprana la ingestión adecuada de nutrientes, influye además de manera negativa en el óptimo suministro de elementos estructurales esenciales para conseguir un crecimiento celular idóneo.

La membrana plasmática es el primer sitio de contacto de la célula con su exterior y su correcto funcionamiento depende del ensamblado e interacción adecuados entre sus distintos componentes estructurales. Por tanto, al analizar la fluidez membranar, el contenido de fosfolípidos, colesterol, y la actividad de varias enzimas membranales (ATPasa-Na⁺/K⁺ y 5'-nucleotidasa), procedentes de eritrocitos de niños que sufrieron desnutrición energética proteica severa, se observó que al comparar los resultados obtenidos entre los distintos parámetros con aquellos que se determinen en membranas de los eritrocitos de niños testigo, encontraremos diferencias significativas.

¹ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, C. P. 09340.

Distrito Federal, México. Correo electrónico: caro@xanum.uam.mx

² Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. C. P. 04510.

Distrito Federal, México. Correo electrónico: prangel@ifisiol.unam.mx

³ Hospital de Rehabilitación Nutricional Cruz Blanca. C. P. 04040. Coyoacán. Distrito Federal, México.

^a Corresponde al autor. Correo electrónico: gool@xanum.uam.mx

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en 20 niños con edades que fluctúan entre los 6 y los 24 meses. Al momento de la toma de muestras de sangre, los niños permanecían internados en el Hospital de Rehabilitación Nutricional Cruz Blanca, ubicado en la Delegación Coyoacán en la Ciudad de México. Los niños se agruparon en eutróficos o testigos ($n = 10$) y niños con DCPS tipo marasmo ($n = 10$). El estado nutricional, el nivel y grado de deficiencia nutricional se determinó comparando el peso y la talla de cada niño respecto al sexo y edad cronológica, según las tablas de medidas somatométricas para la población mexicana (Ramos-Galván, 1976). Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis químico plasmático, en el que se determinaron el contenido de proteínas totales, albúmina, lípidos totales, colesterol y urea (Sharma, y Mahajan, 1987), esto se realizó mediante equipos comerciales (Wiener Lab. Argentina).

Por cada niño se colectaron 3 ml de sangre periférica por punción venosa con jeringa humedecida con heparina (Microlab, México). La sangre se colocó sobre la superficie de una disolución de Ficoll-Hypaque (Microlab, México), que se centrifugó a 1000 g durante 15 min permitiendo una clara separación del plasma, los linfocitos y los eritrocitos. El precipitado eritrocitario se lavó por dos ocasiones en solución salina amortiguadora isotónica (150 mM NaCl y NaH_2PO_4 5 mM a pH 7.4), centrifugándose bajo las condiciones anteriormente descritas. Lo cual fue realizado con el fin de eliminar restos del plasma y otros contaminantes.

Las membranas de los eritrocitos se obtuvieron siguiendo el procedimiento propuesto por Dodge et al. (1963) (Sharma, y Mahajan, 1987). Los eritrocitos fueron lisados, al momento de incubarlos en una disolución hipotónica (NaH_2PO_4 5 mM a pH 7.4) a 4°C, luego se centrifugaron en un rotor 70Ti (Beckman, E.U.A.) a 100,000 g, a 4°C durante 1 h. El precipitado enriquecido en membranas de eritrocitos se lavó por dos ocasiones adicionales en las condiciones descritas anteriormente. El precipitado del último lavado se ajustó a un volumen conocido con solución amortiguadora de lavado y con un cóctel de antiproteasas (1:25 v/v). Todas las muestras procesadas se almacenaron en un congelador a -80°C hasta el momento de realizar las distintas determinaciones.

El contenido de proteína en las membranas aisladas se determinó siguiendo el método sugerido por Lowry y modificado por Markwell et al. (1978) (Markwell, et al., 1978), se empleó albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, EU) como proteína estándar. La mayoría de los análisis posteriores se refieren al contenido de 1 mg de proteína.

La dinámica en las membranas de eritrocitos, se determinó mediante la incorporación del difenil-hexatrieno (DPH), la medición de la intensidad de fluorescencia en dos distintos planos, y por último, el cálculo de la polarización de la fluorescencia. Para ello se colocaron en tubos de ensayo 200 μg de las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas, y se

ajustaron a 2 ml con disolución salina amortiguadora de fosfatos a pH 7.5, a la que se le adicionó el volumen necesario de una mezcla concentrada de difenil-hexatrieno (Sigma, EU) disuelto en dimetilformamida (Merck, México) para obtener concentración final a 2 μM de DPH. La intensidad de fluorescencia se estimó a 25°C y en agitación constante, en un espectrofluorómetro, marca SLM-AMINCO (EU) equipado con polarizadores especiales, para esto se usaron 365 nm de longitud de onda emisión y 430 nm como longitud de onda de excitación (Shinistzky, 1974).

Para determinar el contenido de colesterol en las membranas eritrocitarias, se colocaron alícuotas de las fracciones enriquecidas en tubos de ensayo. A cada tubo se adicionó 1 ml de mezcla de anhídrido acético (6.33 mM/l) en ácido acético (99%). Esta disolución se incubó a una temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se añadieron 0.2 ml de H_2SO_4 (97%), los tubos se colocaron en un baño de agua a 25 °C y posteriormente, la absorbancia se leyó 530 nm. Este mismo procedimiento se realizó para los tubos correspondientes a la disolución patrón de colesterol (concentración de 300 mg/dl) (Wiener, Lab. Argentina) (Dittmer, 1969).

En relación con el análisis de fosfolípidos, primero fue necesaria su extracción (Bligh, 1959). Un volumen de la suspensión membranal se colocó en un tubo de ensayo, al que se adicionaron 5 ml de una mezcla con cloroformo: metanol (2:1 v/v), esta mezcla se mantuvo en agitación constante durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 550 x g a temperatura ambiente durante 10 min con el propósito de eliminar las proteínas precipitadas y otros residuos celulares. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de ensayo, donde se adicionaron 1.25 ml de cloroformo y 0.5 ml de agua desionizada. Esta disolución se mezcló y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores para obtener la fase orgánica. Los disolventes se evaporaron bajo atmósfera de nitrógeno, para realizar la separación de los fosfolípidos.

Este paso se realizó mediante una cromatografía en capa fina en dos dimensiones (Rouser, 1970). Para ello se emplearon placas de vidrio con dimensiones de 20 x 20 cm (ancho por largo) y una capa de 0.25 mm de espesor de sílica gel Sephadex G-60 (Merck, Alemania). En la primera dimensión se utilizó una mezcla con cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (65:25:5 v/v/v), la cámara cromatográfica se saturó durante algún tiempo prudencial y entonces se realizó la separación. La placa se expuso al vacío durante toda la noche y posteriormente se realizó la segunda dimensión empleando cloroformo: acetona:metanol:ácido acético: agua (30:40:10:10:5 v/v/v/v). La identificación de los fosfolípidos se llevó a cabo después del revelado con vapores de yodo 1% en metanol (p/v), y comparando migraciones relativas de los fosfolípidos estándares que se separaron paralelamente, y en las mismas condiciones.

Posteriormente, las zonas señalizadas en la sílica gel para cada uno de los fosfolípidos, se rasparon y colocaron en tubos de ensayo, a los cuales se adicionó 1 ml de ácido perclórico

(Merck, México). La mezcla se incubó a 80°C durante toda la noche. Después, el hidrolizado se recuperó por centrifugación a 1000 x g, a temperatura ambiente durante 15 min. El volumen recuperado se ajustó a 1 ml con agua desionizada, e inmediatamente se añadieron 0.25 ml de una disolución con molibdato de amonio (2.7%) y de H₂SO₄ (2.5N). Luego de agitar, se añadieron 0.065 ml de una disolución de ácido 1,2,4-aminato sulfónico al 8%. Paralelamente se preparó una curva patrón de fosfato bajo las mismas condiciones experimentales que las muestras problemas y se leyó la absorbancia a 660 nm (Dittmer, 1969). Los porcentajes se obtuvieron del cociente del contenido de fósforo por cada fosfolípido.

Para medir la actividad de la ATPasa (Na⁺/K⁺), se empleó el volumen de membranas aisladas que contenía 200 µg de proteína (Swann, 1975). A este volumen se adicionó una disolución de reacción conteniendo 3mM MgCl₂, 3mM ATP, 130mM NaCl, 20mM KCl; 30 mM histidina a pH 7.5 (37°C), en los tubos problemas se añadió ouabaína para que quedase a una concentración final al 1mM. La mezcla se incubó durante 5 min a la misma temperatura, y la reacción se disparó con ATP que duró 5 min (lapso en el cual se considera que corresponde, a menos del 10% del ATP total). La actividad se interrumpió cuando se añadió 0.1 ml de TCA al 50%, los tubos se transfirieron a un baño de hielo. La actividad se determinó por la medición de fósforo inorgánico liberado. Para esto se siguió el mismo procedimiento que se ha descrito para la cuantificación de los fosfolípidos.

En el caso de la 5' nucleotidasa, se utilizó el mismo contenido de proteínas que en la actividad anterior. A cada tubo de ensayo de las muestras a analizar, se adicionó amortiguador Veronal 40 mM a pH 7.5 con Mg²⁺ 10mM, y como sustrato AMP 1mM, se incubaron 10 min a 37°C (Bermeyer, 1965). Los tubos problemas se incubaron con cloruro de níquel como inhibidor de fosfatasa. La actividad se determinó por el contenido de fósforo liberado por hora y por miligramo de proteína.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado, y los datos obtenidos fueron analizados con la prueba estadística de t de Student para establecer el grado de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad, los índices antropométricos se consideran indispensables para estimar el estado nutricional y de crecimiento del niño (Suskind, *et al.*, 1990). La altura correspondiente a una edad cronológica proporciona información asociada al crecimiento lineal, mientras que la relación entre el peso y la altura refleja la armonía del crecimiento, que es particularmente sensible a disturbios en el crecimiento (Onis, *et al.*, 1993).

Los niños considerados como desnutridos mostraron un déficit en peso corporal superior a un 40%, en tanto los niños testigos no mostraron diferencias en peso y talla de acuerdo a su edad cronológica. Según las tablas de valores somatométricos, por el déficit corporal de los niños, presentaban desnutrición

energética proteica severa (DCPS) o de tercer grado. En ella, el organismo casi ha agotado todas las reservas para su sobrevivencia, y el déficit de peso llega a ser mayor al 40% del promedio correspondiente a su edad. En este grado de desnutrición, existen dos variantes, una en que el déficit corporal es menor del 40%, y se presenta edema, denominado kwashiorkor y otro, en el que el déficit puede ser mayor a este porcentaje, que se conoce como marasmo. Tomando en cuenta tal división, podemos considerar que los niños empleados en este estudio correspondieron al segundo grupo.

No obstante, se considera que el déficit peso-talla, no proporciona indicios sobre una posible deficiencia nutricional en calidad (Polberger, *et al.*, 1990). Por tanto, para un mejor diagnóstico, y conocer el grado de avance de las terapias alimenticias en el estado nutricional de un niño que padece desnutrición severa en alguno de sus grados, se hace indispensable la determinación de los parámetros bioquímicos adicionales. Que igualmente podrían auxiliar al médico en el establecimiento real del grado de déficit nutricional, y por otro lado, en la diagnosis temprana de la desnutrición.

En este trabajo realizamos la determinación del contenido de distintos componentes séricos con el propósito de establecer diferencias orgánicas entre los niños que han sufrido deficiencia severa en nutrientes, y aquellos que estaban cabalmente sanos. En el cuadro 1, se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que en los niños que sufrieron DCPS hubo una disminución significativa en el contenido de proteínas (25%), este efecto estuvo asociado con una reducción en el contenido de la albúmina (30%), todo esto cuando realizamos la comparación con los obtenidos en niños testigos.

CUADRO 1. Contenido de distintos componentes en el plasma de niños

	Niños desnutridos	Niños testigos
Características		
No. de niños	10	10
Edad (meses)	6-24	6-24
Sexo F—M	2—8	4—6
Déficit en peso corporal	Superior al 40%	sin déficit
Componente plasmático		
Proteínas totales (g/100 ml)	5.06 ± 0.10*	6.75 ± 0.10
Albúmina (g/100 ml)	2.88 ± 0.10*	4.10 ± 0.12
Urea (g/ 100 ml)	1.39 ± 0.11*	0.65 ± 0.13
Lípidos totales (mg/100 ml)	476.50 ± 181.70	366.60 ± 128.70
Colesterol (mg/100 ml)	145.10 ± 18.7*	192.91 ± 20.0

* t = 7.4, gl, 18; p < 0.001.
F = femenino, M = masculino

Algunos estudios han demostrado que durante la desnutrición se da una disminución en la síntesis de albúmina y otras proteínas (Dramaix, *et al.*, 1993). Igualmente, se considera que existe una íntima relación entre la disposición de proteínas, la ganancia en peso y el crecimiento. Cuando baja la tasa de crecimiento, ocurre una baja de ganancia en peso, y por lo tanto existe una baja disposición de proteínas (Waterlow, J.C. 1973). En individuos que padecieron desnutrición energética-proteica severa, se ha descrito la presencia de hipoalbuminemia en suero, que podría deberse a una disminución en la síntesis de proteínas hepáticas (Sharma y Mahajan, 1987), o bien, a una disminución en la vida media de la proteína (Polberger, *et al.*, 1990). La disminución en el contenido en esta proteína puede generar alteraciones en la presión coloidal-osmótica del plasma, así como una alteración en el transporte de compuestos a través del torrente sanguíneo (Dramaix, *et al.*, 1993).

Una alteración semejante se observó sobre el contenido de urea (ver cuadro 1), cuya disminución en su contenido podría deberse a una baja disponibilidad de compuestos nitrogenados, que provocaría una reducción en la síntesis de proteínas (Baur, *et al.*, 1991), o bien, un catabolismo excesivo, induciendo una redistribución de elementos básicos para conformar proteínas. A este respecto, existen indicios en algunos individuos en los cuales hay una pobre disposición de proteínas y pobre ganancia de peso, son capaces de mantener un crecimiento óptimo y lineal. Se han sugerido varias alternativas para explicar este comportamiento. Una de ellas, considera que las proteínas se redistribuyen entre los tejidos, es decir, los aminoácidos necesarios para realizar síntesis de proteínas se desplazan de órganos viscerales hacia el músculo y esqueleto (Waterlow, 1973). Otra alternativa contempla que la desnutrición severa afecta al metabolismo de aminoácidos, impidiendo o alterando los sistemas de aminoácidos, por ejemplo, el transporte de alanina dependiente de sodio (Gómez-Angelats, *et al.*, 1995).

Sobre el contenido de lípidos séricos, como podemos observar en el cuadro 1, no hubo diferencia entre ambos grupos de niños. Noakes *et al.* (2000) consideran que una modificación en el perfil de lípidos plasmáticos podría relacionarse con una modesta pérdida de peso, resultante de la imposibilidad de llevar a cabo la síntesis endógena de algunos lípidos, entre ellos, el colesterol, contribuyendo a una disminución en el contenido de lípidos circulantes (Noakes y Clifton, 2000).

Nuestros resultados sobre el contenido de colesterol muestran que hay un disminución en el plasma de niños severamente desnutridos (ver cuadro 1). Esta alteración podría estar asociada con algunas anomalías hepáticas (hígado graso), que se han observado en niños que padecen esta enfermedad.

Cabe señalar que el tiempo en que se lleva a cabo la medición de lípidos en el paciente, y la composición de la dieta durante la estrategia alimenticia para la rehabilitación nutricional, son dos de los factores que deben contemplarse para la interpretación del perfil de lípidos plasmáticos y su

relación con la pérdida de peso (Noakes y Clifton, 2000).

Los radicales libres se han implicado en el desarrollo de muchas enfermedades, igualmente podrían verse involucradas las deficiencias en los compuestos antioxidativos. A este respecto se considera que en la desnutrición severa se producen anomalías en el sistema de protección por daño oxidativo a través de radicales libres o especies reactivas derivadas del oxígeno. En esta enfermedad se ha informado que existe una disminución significativa en los niveles de glutatión peroxidasa asociada al bajo contenido de selenio, además de una disminución en las concentraciones de vitamina E (Thurman, 1990; Albretch y Pélisser, 1995).

En la patogénesis del edema y anemia que frecuentemente se describen en niños que padecen desnutrición energética-proteica severa tipo kwashiorkor, se ha propuesto que ambos signos clínicos bien podrían deberse a un desajuste entre la producción de radicales tóxicos y su vida media (Ashour, *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta la descripción de las distintas deficiencias en elementos básicos para conformación de estructuras celulares, y que las membranas plasmáticas podrían ser el sitio blanco ideal para la actuación de los radicales libres. En las membranas de eritrocitos de niños con desnutrición severa, se han descrito alteraciones en la composición lipídica en sus membranas, que de alguna manera podrían influir en su capacidad de transporte de gases respiratorios, o bien, con su vida media (Balduini, *et al.*, 1976; Graham, 1982).

Con todo lo anterior, en una primera instancia se determinó la polarización de la fluorescencia de la sonda hidrofóbica, el difenil-hexatrieno, como una medida de la dinámica en las membranas de eritrocitos de niños. Como se muestra en el cuadro 2, los valores de polarización calculados para las membranas procedentes de niños que sufrieron desnutrición severa, fueron significativamente mayores que los resultados obtenidos para las membranas de los niños testigos.

CUADRO 2. El efecto de la desnutrición energética-proteica severa sobre la polarización de fluorescencia del difenil-hexatrieno en las membranas de eritrocitos de niños

Parámetro de polarización (unidades arbitrarias)	
Niños Desnutridos	Niños Testigos
0.1005	0.1264
0.1028	0.1281
0.1035	0.1310
0.1054	0.1401
0.1070	0.1420
0.1076	0.1440
0.1079	0.1456
0.1086	0.1483
0.1148	0.1483
0.1166	0.1778
0.1074 ± 0.005*	0.143 ± 0.014

* t = 7.29, gl 18, p < 0.001

La alteración en la dinámica de los lípidos en la membrana plasmática puede tener implicaciones de tipo estructural, bien podría deberse a algunos cambios en la composición de la membrana en respuesta a la falta de nutrientes. Igualmente podría relacionarse en parte a una mayor susceptibilidad de las membranas eritrocitarias de los niños desnutridos a los daños oxidativos, a través de radicales libres o especies químicas reactivas derivadas del oxígeno, y depender de un desajuste entre compuestos pro y antioxidativos.

Sive *et al.*, (1993) encontraron en eritrocitos de niños kwashiorkor, un aumento significativo en el contenido de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico, sustancia que sirve como un indicador de lipidoperoxidación (Sine, *et al.*, 1993).

Es importante señalar, que en nuestro estudio, las membranas aisladas por choque osmótico permitieron determinar el nivel de desorden de los fosfolípidos, debido a que reflejan un estado in situ de la membrana. Ya que la determinación de la polarización de la fluorescencia en eritrocitos completos tiene la desventaja que ocurre el fenómeno de dispersión de la luz adjudicable a que la hemoglobina no permite el paso de luz, impidiendo medir con cierto grado de precisión la fluorescencia del difenil-hexatrieno, conduciendo a resultados falsos (Dickens, *et al.*, 1988).

En general, podemos considerar que las membranas de eritrocitos de niños severamente desnutridos, no se encuentran en un estado completamente fluido, y que la dinámica en sus membranas, podría depender en parte de la relación de los componentes lipídicos que la constituyen.

Al analizar el contenido de los principales lípidos estructurales de las membranas biológicas. Como se muestra en el cuadro 3, la desnutrición severa no produjo cambios en el contenido total de fosfolípidos en los orgánulos procedentes de eritrocitos. En tanto que el contenido total de colesterol fue significativamente mayor en las membranas eritrocitarias de los niños severamente desnutridos (1.01 nmol/mg proteína) en comparación, al contenido cuantificado en las membranas de niños testigos (0.71 nmol/mg proteína). Teniendo en cuenta que el colesterol produce un efecto condensante en el interior de las membranas biológicas, permitiendo una mayor compactación de las cadenas de ácidos grasos, y por ende, una disminución en el desplazamiento lateral de los componentes en el plano de la membrana. Podemos considerar que la modificación en la relación entre los componentes lipídicos en las membranas de eritrocitos de los niños severamente desnutridos, podría estar relacionada con la disminución en la polarización de la fluorescencia del DPH, calculada en las mismas membranas.

Otro punto que decidimos conocer fue el contenido porcentual de distintos fosfolípidos, teniendo en cuenta que algunos de éstos tienen un papel importante en la interacción lípido-proteína. En algunos casos, cuando las proteínas de membrana se purifican, se les encuentra asociadas a un

CUADRO 3. La variación en el contenido de los principales lípidos en las membranas de eritrocitos de niños

Fosfolípidos totales (nmol/mg proteína)		Colesterol total (nmol/mg proteína)	
Niños desnutridos	Niños testigos	Niños desnutridos	Niños testigos
3.80	4.00	0.72	0.59
4.50	4.21	0.78	0.65
4.73	4.28	0.92	0.69
4.82	4.31	0.93	0.70
5.10	4.37	1.00	0.71
5.40	4.55	1.08	0.72
5.45	4.65	1.10	0.73
5.67	5.40	1.10	0.74
6.20	5.50	1.11	0.77
6.40	5.63	1.36	0.83
5.21 ± 0.79	4.7 ± 0.6	1.01 ± 0.18*	0.71 ± 0.06

* t = 4.81, gl 18, p < 0.001

fosfolípido específico, mismo que puede ser esencial para su funcionamiento, en el caso de ser una enzima, para lograr su óptima actividad catalítica.

En el cuadro 4, se muestran los valores porcentuales en los distintos fosfolípidos cuantificados después de la cromatografía bidimensional. Como se puede observar en las membranas eritrocitarias de niños con desnutrición severa tipo marasmo, hubo un aumento en el contenido en la fosfatidilserina (15%), en relación con los porcentajes obtenidos en las membranas de niños testigos. Este efecto diferencial sobre el contenido de fosfatidilserina, no coincide con hallazgos anteriores sobre los efectos de la deficiencia severa de nutrientes.

CUADRO 4. El contenido porcentual en algunos fosfolípidos en las membranas de eritrocitos de niños

	Niños desnutridos	Niños Testigos
Fosfatidilserina	12.15*	9.50
Fosfatidiletanolamina	27.80	28.18
Fosfatidilcolina	29.00	27.60
Fosfatidilinositol	5.90	6.92
Otros	25.15	27.80
Total	100	100
N	5	5

* t = 5, gl 8, p < 0.02.

En membranas de eritrocitos en niños con desnutrición tipo kwashiorkor, donde se ha informado que hay una disminución en el contenido en la fosfatidilcolina (Thurman, 1990). A este respecto, debemos tomar en cuenta que los niños empleados en este estudio mostraron signos y síntomas clínicos que describen al tipo marasmo, y por lo tanto, las alteraciones estructurales reflejadas al parecer son distintas. Bien podríamos suponer que las diferencias entre los orgánulos de ambos tipos de niños desnutridos, podría asociarse a una distinta susceptibilidad al ataque oxidativo a sus respectivas membranas celulares.

Un último punto para analizar fue la actividad en dos enzimas. En las membranas de eritrocitos de niños desnutridos, la actividad de la ATPasa Na⁺/K⁺ mostró valores inferiores (casi al doble), que la actividad determinada en aquellas membranas que se aislaron de los niños testigos. El mismo efecto inhibitorio se observó sobre la actividad de la 5 nucleotidasa (ver cuadro 5).

CUADRO 5. La Influencia de la desnutrición energética-proteica severa sobre la actividad de algunas enzimas en eritrocitos de niños

ATPasa Na ⁺ /K ⁺ * (μmol/h/mg proteína)		5'-Nucleotidasa ** (μmol/h/mg proteína)	
Niños desnutridos	Niños testigos	Niños desnutridos	Niños testigos
2.25	5.25	0.389	1.16
2.75	5.50	0.391	1.26
2.90	5.70	0.406	1.32
3.25	5.75	0.415	1.37
3.30	6.55	0.425	1.45
3.36	6.72	0.486	1.64
3.45	6.75	0.569	1.69
3.60	7.50	0.648	1.96
3.75	8.00	0.662	2.24
4.50	9.50	0.900	2.89
3.31 ± 0.61	6.72 ± 1.32	0.53 ± 0.17	1.70 ± 0.53

*t = 7.43, gl, 18; p < 0.001

** t = 6.59, gl, 18; p < 0.001

Nuestros resultados del efecto de la desnutrición severa sobre la actividad de enzimas membranales de eritrocitos severamente desnutridos tipo marasmo, coinciden con otros autores. Willis y Golden (1988) encontraron una menor actividad en la ATPasa Na⁺/K⁺, en niños con este nivel de desnutrición. Se sugiere que tal anomalía se debió a una disminución en el estado de transición de la bomba metabólica (Willis, 1988).

En los niños kwashiorkor, a pesar de padecer el mismo grado de desnutrición, las anomalías funcionales producidas sobre este sistema enzimático membranar son distintas. En eritrocitos de niños que padecieron este grado de la enfermedad, Kaplay y Ramanadham (1978) determinaron un aumento en un 100% en la actividad de la ATPasa Na⁺/K⁺ (Kaplay y Ramanadham, 1978). Posteriormente, Ramanadham y Kaplay (1982) informaron que sus anteriores observaciones podrían relacionarse con un aumento en el contenido de la enzima en las membranas de los eritrocitos.

En el caso de nuestros resultados, estos podrían estar asociados a otro tipo de respuesta por parte del organismo a la deficiencia energétoproteica severa. En niños severamente desnutridos tipo kwashiorkor, se ha determinado un aumento en la insaturación de ácidos grasos, que se correlaciona con un aumento en la relación de ácidos grasos insaturados/saturados (Vajreswari, *et al.*, 1990) que bien podría ligarse con las variaciones en el contenido de algún(os) ácido(s) graso(s), como es el caso del ácido araquidónico. En las membranas de eritrocitos de niños tipo kwashiorkor existe un mayor contenido de este lípido que en las membranas de niños desnutridos

tipo marasmo (Dipple *et al.*, 1982).

Otro punto importante a destacar, es el hecho que el ambiente lipídico que circunda a un sistema enzimático membranar, puede influir en su actividad. En células de niños desnutridos tipo kwashiorkor, se ha observado un aumento en la dinámica membranar que se asocia con una intensificación en la actividad ATPasa Na⁺/K⁺ (Waterlow, 1973). Por otro lado, la actividad de esta misma enzima en eritrocitos humanos, se puede modificar bajo un tratamiento con fosfolipasa, y reactivar por la adición de fosfatidilserina y ácido fosfatídico (Krishnaswamy, 1989).

En el caso de la actividad 5' nucleotidasa, en algunos trastornos metabólicos se ha sugerido que en su microambiente lipídico requiere de los esfingolípidos circundantes para que la enzima presente una óptima actividad catalítica (Baur, *et al.*, 1991). No podríamos descartar que en la desnutrición severa tipo marasmo, los cambios en el contenido de fosfatidilserina estén implicados en modificaciones en las propiedades físicas de la membrana y en la definición del microambiente lipídico idóneo, y por ende en la disminución en la actividad, determinada en las membranas de eritrocitos.

A este respecto, López-García *et al.*, (1994) sugieren que los diacilgliceroles y la fosfatidilserina alteran la estructura de membrana para la activación interfacial de distintas enzimas. Estos autores proponen que la activación enzimática por ambos lípidos requiere del sinergismo entre las interacciones lípido-proteína y las propiedades físicas de la membrana (López-García, *et al.*, 1994). Esto se podría ajustar al caso de la 5' nucleotidasa, dadas las anomalías observadas.

Como hemos señalado, queda patente que la desnutrición energétoproteica produce anomalías en la composición y propiedades físicas de los componentes membranales, y que éstos influyeron en la funcionalidad de algunas enzimas membranales. Igualmente, como se discutió, hay claras diferencias en los mismos parámetros y repercusiones entre las membranas eritrocitarias de niños severamente desnutridos tipo marasmo, y aquellas procedentes de niños testigo y aun con los informes de los estudios realizados en membranas de niños kwashiorkor.

Como hemos visto, el estudio en la dinámica y composición de las membranas biológicas es complejo, dadas las anomalías múltiples que pueden producirse en respuesta a factores ambientales. No obstante, algunos hallazgos pueden permitir establecer una relación causa-efecto, como es el caso de modificaciones estructurales asociadas con alteraciones funcionales.

En el futuro sería importante estudiar en las membranas de eritrocitos de niños con desnutrición severa tipo marasmo, los niveles de esterificación de los ácidos grasos, de compuestos oxidativos, y de los sistemas de protección hacia estos últimos, y la posible recuperación en los distintos parámetros físicos y bioquímicos, una vez que los niños severamente desnutridos ingresen a una estrategia de rehabilitación nutricional. Estos estudios serían prioritarios, dada la importancia que tiene la membrana plasmática en la función fisiológica que el eritrocito cumple en el organismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Albretch, R. y Pélisser, M. A. "About the oxidative status in children with kwashiorkor". *Food. Chem. Toxicol.*, 33, 1995. Pp. 1081-1083.
- Ashour, M. N., Salem, S. I., El-Gabdan, H. M., Elwan, N. M. y Basu, T. K. "Antioxidant in children with protein-energetic malnutrition (PEM)". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 53, 1999. Pp. 669-673.
- Balduini, C. L., Tira, M. E., Ascari, E. y Balduini, C. "Glycopeptides of erythrocyte membranes in some hematology disorders". *Acta Haemat.* 55, 1976. Pp. 282-288.
- Baur, L. A., Waters, D. L., Allen, B. J., Blagojevic, N. y Gasnick, K. "Nitrogen deposition in malnourished children with cystic fibrosis". *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 1991. Pp. 503-511.
- Bermeyer, H. U. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Ed. Academic Press, 1965. 871 pp.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. "A rapid method of total lipid extraction and purification". *J. Biochem. Physiol.*, 37, 1959. Pp. 911-917.
- Cravioto, J. y Arrieta, R. *Nutrición, desarrollo mental, conducta y aprendizaje*. 2a. ed. México: INCYTAS-DIF, 1985. 191 pp.
- Cuevas-Covarrubias, S. A., Rojo-Callejas, F., Juárez-Oropeza, M. A., Díaz-Zagoya, J. C. "Erythrocyte fatty acids in children with severe protein calorie malnutrition". *Rev. Invest. Clin.* 46, 1994. Pp. 197-201.
- Dickens, D. F., Snow, T. R., Green, V. y Weglicki, W. B. "The effect of erythrocyte associates light scattering on membrane fluorescence polarization". *Mol. Cell. Biochem.* 79, 1988. Pp. 91-94.
- Dipple, Y., Gordon, L. M. y Houslay, M. D. "The activity of 5' nucleotidase in liver plasma membrane is affected by increase in bilayer fluidity achieved by anionic drugs but not by cationic drugs". *J. Biol. Chem.* 257, 1982. Pp. 1811-1815.
- Dittmer, J. C y Wells, M. A. "Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components". *Meth. Enzymol.*, 6, 1969. Pp. 486-487.
- Dodge, J. T., Mitchell, C. y Honahon, D. J. "The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocyte". *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 1963. Pp. 119-30.
- Dramaix, M., Hennart, P., Brasseur, D., Bahwere, P., Mudjene, O., Tonglet, R., Donnen, P. y Smets, R. "Serum albumin concentration, arm circumference, and oedema and subsequent risk of during in children in central Africa". *Brit. Med. J.*, 307, Pp. 710-713.
- Gómez-Angelats, M., Ruiz-Montasell, B., Felipe, A., Marín, J. J. G., Casado, J. y Pastor-Anglada, M. "Effect of protein malnutrition on neural aminoacid transport by rat hepatocytes during development". *Am. J. Physiol.*, 268, 1995. Pp. E368-E374.
- Graham, J. "Fractionation of mammalian cell membranes in iodinated density gradient media". *J. Biol. Cell.* 45, 1982. Pp. 476-482.
- Iyengar, G. V. y Nair, P. P. "Global outlook on nutrition and the environment: meeting the challenges of the next millenium". *Sci. Total Environ.*, 249, 2000. Pp. 331-334.
- Kaplay, S. S. "Erythrocyte membrane Na⁺, K⁺ activated adenosine triphosphatase in protein-calorie malnutrition". *Am. J. Clin. Nutr.*, 31, 1978. Pp. 579-84.
- Kaplay, S. S. y Ramanadham, M. "High erythrocyte membrane (Na⁺/K⁺)-ATPase in kwashiorkor, in vivo reversal by diuretic". *Clin. Chim. Acta.*, 88, 1978. Pp. 89-92.
- Krishnaswamy, K. "Drug metabolism and pharmacokinetics in malnourished children. *Clin. Pharmacokinetics*, 17, 1989. Pp. 68-88.
- Leichsenring, M., Sutterlin, N., Less, S., Baumann, K., Anninos, A., y Becker, K. "Polyunsaturated fatty acids in erythrocyte and plasma lipids of children with severe protein energy malnutrition". *Act. Pediatr.* 84, 1995. Pp. 516-20.
- López-García, F., Villalaín, J. y Gómez-Fernández, J. C. "Diacylglycerol, phosphatidylserine and Ca²⁺: a phase behavior study. *Biochim. Biophys.*" *Acta.* 1190, 1994. Pp. 264-272.
- Marion, A. H., Johan, W. M. y Gerard, H. "Membrane fluidity of non-activated and activated human blood platelets". *Biochem. Biophys. Acta.* 1025, 1990. Pp. 173-178.
- Markwell, A. K., Jaos, S., Baiber, L. L. y Tolbert, N. E. "Lipoprotein samples: modified Lowry method". *Anal. Biochem.*, 72, 1978. Pp. 296-99.
- Monárrez, J. y Martínez, H. "Prevalence of malnutrition in Tarahumara children under 5 years of age in the municipality of Guachochi, Chihuahua". *Salud Pública Mex.* 42, 2000. Pp. 8-16.
- Noakes, M. y Clifton, P. M. "Weight loss and plasma lipids". *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 2000. Pp. 65-70.
- Onis, M., Monteiro, C., Akre, J. y Clugston, G. "The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO global database on child malnutrition". *Bull. WHO.*, 71, 1993. Pp. 703-712.
- Polberger, S. K. T., Fex, G. A., Axelsson, I. A. y Raiha, N. C. R. "Eleven plasma protein as a indicators of protein nutritional status in very low birth weighth infants". *Pediatrics.* 86, 1990. P. 916.

- Ramanadham, M. y Kaplay, S. S. “³H-Ouabain binding to human erythrocytes in protein-energy malnutrition”. *Clin. Chim. Acta.*, 122, 1982. Pp. 271-277.
- Ramos-Galván R. Somatometría Pediátrica. *Arch. Inves. Med.* (México). 6. 1976. Pp. 1-5.
- Rouser, G., Fleischer, S. y Yamamoto. A. “Two dimensional thin-layer chromatographic separation of polar lipid and determination of phosphorus analysis of spot”. *Lipids*, 15, 1970. Pp. 494-496.
- Sharma, G. y Mahajan, M. “Biochemical assesment of protein-calorie malnutrition”. *Ind. J. Nutr. Dietet.* 24, 1987. Pp. 199-204.
- Shinistzky, I. M. “Difference in microviscosity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal lymphocytes and malignant lymphoma cell”. *J. Mol. Biol.*, 85, 1974. Pp. 603-605.
- Sine, A. A., Subotzky, E. F., Malan, H., Dempster, W. S. y Heese, H. D. “Red blood cell antioxidant enzyme concentrations in kwashiorkor and marasmus”. *Ann. Trop. Paediatr.* 13, 1993. Pp. 33-38.
- Suskind, D., Murthy, K. K., Suskind, R. M. “The malnourished child: an overview”. En: *The malnourished child* (Suskind, R.M. y Suskind, L.L. eds). Nestlé Nutrition Series. Vol. 19. New York, 1990. Pp. 1-17.
- Swann, A. C. y Alberts, R. W. “Sodium and potassium activated ATPase of mammalian brain. Regulation of phosphatase activity”. *Biochim Biophys. Acta.* 382, 1975. Pp. 435-456.
- Thurman, D.I. “Antioxidants and prooxidants in malnourished populations”. *Proc. Nutr. Soc.*, 49, 1990. Pp. 247-259.
- Vajreswari, A., Narayanareddy, K. y Roa, P. S. “Fatty acid composition of erythrocyte membrane lipid obtained from children suffering from kwashiorkor and marasmus”. *Metabolism.* 39, 1990. Pp. 779-782.
- Waterlow, J. C. “Note on the assessment and clasification of protein-energy malnutrition in children”. *Lancet*, 2. Pp. 87-89.
- Willis, J. S. y Golden, M. H. “Active and passive transport of sodium and potassium ions in erythrocyte fatty acids in children with severe protein-calorie malnutrition”. *Eur. J. Clin. Nutr.* 42, 1988. Pp. 635-645.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su valiosa colaboración al Sr. Eduardo Espíndola Serafín. Este trabajo fue financiado parcialmente por Laboratorios SANFER, S. A de C. V. (México) y Wiener, Lab. (Argentina).

RELACIÓN ENTRE LA INTOLERANCIA A LA GLUCOSA Y ALGUNOS FACTORES DE Riesgo a la diabetes mellitus tipo 2

Gloria Ruiz Guzmán,¹ Alma Guadalupe Arellano Meneses,² Marta Ruiz Luis,³
Arturo L. Preciado López⁴ y Arturo E. Acevedo Gómez⁵

La diabetes mellitus es una de las enfermedades con mayor prevalencia tanto a nivel mundial como nacional, y es considerada como un problema de salud pública debido a sus consecuencias médicas, sociales y económicas. La diabetes mellitus tipo 2 es el tipo más frecuente y se ha determinado que aproximadamente de un 10 a 15 por ciento de la población mexicana la padece. Se ha propuesto que existen algunos factores que pueden acelerar la aparición de la enfermedad, por lo que el estudio de esos factores en individuos asintomáticos puede permitir que se adopten medidas preventivas que retrasen su aparición y, en consecuencia, permitan a los pacientes tener una mejor calidad de vida. En el presente estudio se analizó la importancia de algunos factores en relación con la tolerancia oral a la glucosa en sujetos asintomáticos. Los resultados muestran que factores como los antecedentes familiares de diabetes, el sobrepeso, el sexo, la edad, el tipo de dieta, el estrés y la actividad física están relacionados con la intolerancia a la glucosa.

INTRODUCCIÓN

Tanto a nivel nacional como en países en desarrollo y en grupos étnicos específicos que han sufrido cambios recientes de estilo de vida, ha sido posible observar un incremento en la frecuencia de diabetes mellitus (DM) y, en particular de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) o no dependiente de insulina. Numerosos estudios epidemiológicos en poblaciones rurales y urbanas con individuos genéticamente semejantes, así como otros realizados en grupos humanos que han cambiado sus hábitos de ejercicio y de alimentación aun permaneciendo en la misma área geográfica, han demostrado que estos factores ambientales juegan un papel determinante en la expresión clínica de la DM2 en individuos genéticamente susceptibles.

Existen suficientes datos epidemiológicos para afirmar que la DM2 se está convirtiendo en forma muy rápida en uno de los principales problemas de salud pública del país. Los estudios disponibles demuestran un aumento constante de la prevalencia y de la mortalidad debido a este padecimiento en los últimos 10 años.

Actualmente la DM ocupa el cuarto lugar como causa de

muerte en el país, aunque para ciertos grupos de edad se considera como la primera.

Después de considerar la heterogeneidad en los métodos diagnósticos y las características de las poblaciones en los distintos estudios, se estima que la prevalencia de diabetes en el país es de aproximadamente 8 por ciento cuando se incluyen individuos mayores de 15 años y alrededor de 10 por ciento cuando se incluyen únicamente mayores de 30 años.

Como consecuencia de las complicaciones más frecuentes, se hace necesaria la atención especializada en diversas áreas de la medicina, ya que en el país es la primera causa de ceguera, retinopatía, nefropatía y amputaciones, por un lado, y por el otro, se incrementa la demanda de servicios, la generación de un alto número de incapacidades e invalidez reflejada en un aumento en el ausentismo laboral que, junto con el costo de la atención médica, provoca un deterioro en la economía a nivel individual, familiar y social que se incrementa año con año.

Debido al gran impacto que produce en las sociedades este padecimiento, se han llevado a cabo investigaciones que enfocan aspectos etiopatogénicos, de diagnóstico, tratamiento

¹ Maestra en Investigación en Salud Pública, UAM-Iztapalapa. Correo electrónico: rugg@xanum.uam.mx

² Bióloga, UAM-Iztapalapa. Correo electrónico: agam@xanum.uam.mx

³ Químico Farmaco Biólogo, Facultad de Estudios Superiores- Zaragoza, UNAM.

⁴ Maestro en Biología Experimental, UAM-Iztapalapa. Correo electrónico: sacbs@xanum.uam.mx.

⁵ Doctor en Sociología, UNAM.

y prevención, encaminados a conocer y descubrir los procesos tanto individuales como colectivos que influyen en la enfermedad (O'Brein y Corral, 1988; Ferrannini y DeFronzo, 1989).

La incidencia de la DM2 en la población de adultos es alta y aumenta en ciertos grupos de riesgo. Los factores mejor identificados que favorecen el desarrollo de diabetes son: mayor edad, obesidad, en particular la obesidad central, menor nivel socioeconómico y los cambios recientes en estilo de vida, en particular el cambio de vida rural a urbana (Ríos, 1995).

En el estado basal, la mayor parte (aproximadamente el 70 por ciento) de la glucosa es captada por los tejidos independientes de la insulina, principalmente el cerebro y por lo tanto, el principal factor responsable de la hiperglicemia en ayunas es la producción hepática incrementada de glucosa. Después de la ingestión de glucosa, los tejidos insulino-dependientes (principalmente el músculo y el hígado) se vuelven más importantes en el manejo de una carga de glucosa.

Se ha descrito que los individuos con alteración de la tolerancia a la glucosa se caracterizan por: una respuesta temprana disminuida de insulina al estímulo de la glucosa; respuesta total de insulina normal o aumentada; reducción de la unión de insulina a su receptor; alteración de la supresión de la producción hepática de glucosa y disminución de la captación periférica de la glucosa. También pueden encontrarse alteraciones posreceptor en la utilización de la glucosa. Al empeorar la respuesta de la insulina a la glucosa, aparece hiperglicemia en ayunas. La naturaleza progresiva de la anomalía de la secreción de insulina puede ser el resultado de varios factores:

- 1) La historia natural del defecto de las células β del páncreas, que puede estar genéticamente determinado
- 2) Hiperglicemia persistente, que puede tener efectos perjudiciales sobre las células β y causar una alteración progresiva en la secreción de insulina
- 3) Alguna otra alteración metabólica todavía no identificada, que se encuentra en el ambiente diabético.

La DM2 es un trastorno heterogéneo caracterizado por la disminución de la sensibilidad de los tejidos (hígado y músculo) a la insulina y alteración de las células β . Existe gran controversia en relación a cuál defecto constituye la lesión inicial en la patogenia de este tipo de diabetes (alteración en la secreción de la insulina o alteración de la acción de la insulina).

En años recientes se ha acumulado una cantidad significativa de evidencias que señalan que los defectos en la secreción de la insulina pueden conducir a la resistencia a la insulina y viceversa. Por lo tanto, una vez que el síndrome diabético florido se ha establecido, es imposible identificar en un determinado individuo si el defecto primario se originó en las células β o en los tejidos periféricos/hepáticos. Obviamente se necesita más infor-

mación acerca de la relación entre las anomalías en la secreción y en la acción de la insulina para comprender adecuadamente la DM2 (Stumvoll, Mitrakou *et al.*).

Es importante señalar que es fundamental contar con instrumentos que tengan un alto grado de sensibilidad y especificidad y que permitan tener el menor número de predicciones falsas, sobre todo en padecimientos que por su alta prevalencia e incidencia son de particular interés para la salud pública.

La identificación de la intolerancia a la glucosa es importante ya que los individuos con esta alteración representan un grupo de alto riesgo de desarrollar diabetes en el futuro (se ha determinado que aproximadamente el 25 por ciento de los intolerantes desarrollan diabetes). Esto refuerza la necesidad de utilizar la curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) en la identificación de riesgo y por lo tanto, en la aplicación de medidas de prevención.

La CTGO como método de diagnóstico puede interpretarse de acuerdo a diferentes criterios aceptados actualmente (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1998; American Diabetes Association, 2000) en la que los parámetros más importantes que se buscan son el pico hiperglucémico, el tiempo en que la glucemia recupera la concentración basal, el área bajo la curva y la concentración media de glucosa durante el tiempo de la prueba. La CTOG se lleva a cabo con la administración oral de glucosa a razón de 1.75 g/kg de peso corporal o de 75 g para hombres adultos y mujeres no embarazadas y con intervalos de medición de la glucemia cada 30 minutos durante 3 h. Esta prueba ha demostrado ser una excelente herramienta de diagnóstico temprano de alteraciones metabólicas como puede ser la intolerancia a la glucosa y la DM. El objetivo para realizar este trabajo fue determinar la frecuencia de alteraciones en la tolerancia a la glucosa en una población asintomática para la DM, así como determinar el peso que tienen diferentes factores considerados como de riesgo a la DM sobre esas alteraciones.

METODOLOGÍA

Se realizaron pruebas de tolerancia oral a la glucosa en sujetos que no se supieran diabéticos, se encontraran asintomáticos respecto a la diabetes mellitus y en el caso de las mujeres, que no se encontraran embarazadas al momento del estudio. Se excluyeron aquellos sujetos que al inicio de la prueba presentaran una glucemia superior a los 126 mg/dl, ya que este valor es diagnóstico de DM. Todos los sujetos que participaron firmaron una carta de consentimiento informado y se les proporcionaron de manera oral y escrita las indicaciones a seguir antes de la aplicación de la misma.

Se pidió a los participantes que tres días antes de la prueba consumieran un mínimo de 250 a 300 gramos adicionales de carbohidratos y se presentaran con un ayuno de entre 8 y 16 horas.

Los pacientes fueron canalizados desde el inicio de la prueba por punción en la vena basilíca previa asepsia y antisepsia

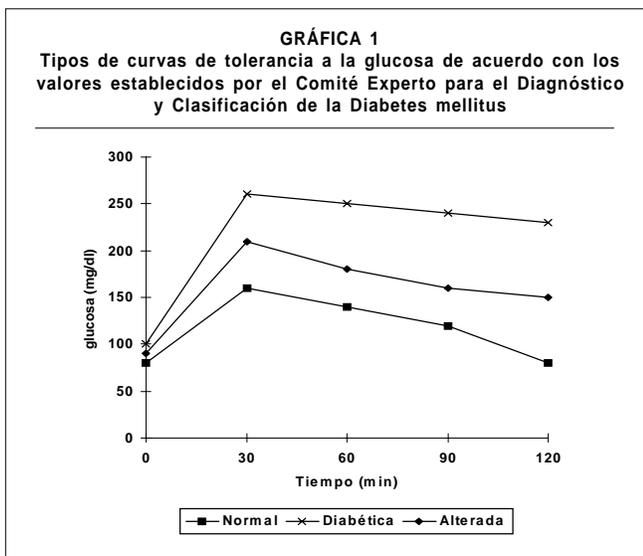
y se mantuvo una vía permeable con solución isotónica de cloruro de sodio. Se añadió al equipo de venoclisis una llave de tres vías, por medio de la cual se obtuvieron las muestras cada 30 min. Los valores de glucemia se determinaron con el sistema electroquímico Precisión QID (Medisense de Abbott) y se interpretaron de acuerdo con los criterios del Comité Experto para el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus para sangre venosa (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus) (tabla 1).

TABLA 1
Criterios de clasificación para las curvas de tolerancia oral a la glucosa de acuerdo con el Comité Experto para el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes mellitus.

	Normal	Diabética	Alterada
En ayunas	< 110 mg/dl	> 126 mg/dl	Entre 110 y 126 mg/dl
A los 30, 60 o 90 min de la carga de glucosa	< 200 mg/dl	≥ 200 mg/dl	≥ 200 mg/dl
A las 2 h de la carga de glucosa	< 140 mg/dl	≥ 200 mg/dl	entre 140 y 200 mg/dl

Se determinó la glucemia en ayuno y si ésta era menor a 126 mg/dl se procedió a administrar una carga oral de 75 g de glucosa disuelta en 250 ml de agua y posteriormente se determinó la glucemia a los 30, 60, 90, 120 y 150 min.

Las curvas representativas de cada uno de estos tipos se muestran en la gráfica 1.



Adicionalmente se evaluaron diferentes variables somatométricas y factores de riesgo por medio de un cuestionario realizado para este fin. Los cuestionarios constan de las siguientes secciones:

- Ficha de identificación. Datos generales (nombre, dirección, edad, sexo, ocupación), escolaridad, antecedentes personales patológicos).

- Formulario de factores de riesgo. Entorno psicosocial, antecedentes familiares de diabetes e hipertensión, alcoholismo, tabaquismo, antecedentes ginecoobstétricos, actividad física, tipo de dieta.
- Somatometría. Peso, talla, diámetro de cintura y cadera.

Con los valores somatométricos se calcularon el índice de masa y la relación cintura/cadera (RCC) y se determinó si los sujetos tenían riesgo mediante la evaluación de cada uno de los factores estudiados.

Una vez realizados los estudios de laboratorio, los resultados obtenidos de las curvas de glucosa se relacionaron con los factores de riesgo por medio de un análisis multivariado de discriminantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La población estudiada estuvo formada por 121 hombres y 184 mujeres, con un rango de edad de 17 a 64 años ($x = 27.9 \pm 9.6$). Se consideraron como factores de riesgo positivos el tener un IMC mayor de 25, una RCC mayor de 0.79 para las mujeres y de 0.99 para los hombres, el tener antecedentes familiares de DM directos (padres) o indirectos (abuelos y tíos tanto maternos como paternos), el consumir una dieta rica en carbohidratos (más de 12 puntos en la evaluación alimenticia), el tener mayor puntuación en las esferas estresantes que en las correspondientes a los deportes, y una relación actividad/sedentarismo que favorecía a este último. El alcoholismo y tabaquismo, así como los antecedentes ginecoobstétricos se evaluaron de acuerdo con la encuesta nacional de enfermedades crónicas y se consideró que existía riesgo cuando alguno de estos factores se evaluaba como positivo. Los resultados relacionados con la presencia de factores de riesgo se muestran en la tabla 2.

TABLA 2
Frecuencia de factores de riesgo encontrados en la población estudiada

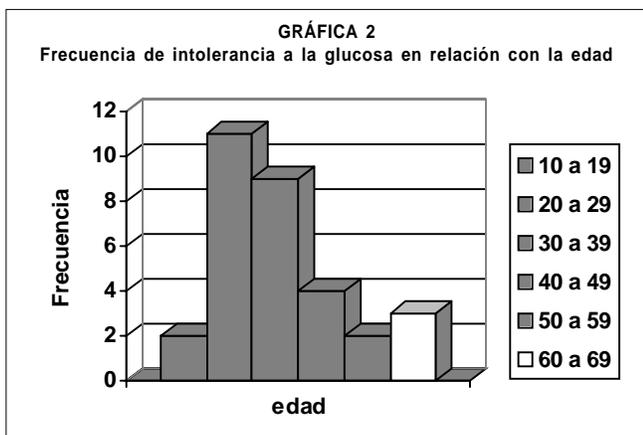
Factor	Frecuencia total (n=305)	Hombres (n=121)	Mujeres (n=184)
Antecedentes de DM	172 (56%)	70 (58%)	102 (55%)
Dieta rica en carbohidratos	144 (47%)	69 (57%)	75 (41%)
Relación cintura/cadera	110 (36%)	4 (3%)	106 (58%)
Baja actividad física	96 (31%)	43 (36%)	53 (29%)
Estrés	74 (24%)	25 (21%)	49 (27%)
Sobrepeso	36 (12%)	10 (8%)	26 (14%)

Los factores alcoholismo, tabaquismo y antecedentes ginecoobstétricos presentaron una frecuencia demasiado baja como para poder ser incluidos en el análisis, lo cual es debido a las características de la población estudiada, especialmente en lo referente a la edad de los sujetos en estudio.

Es importante notar que un porcentaje alto de los sujetos estudiados presenta antecedentes familiares de DM, aunque podríamos considerar que este porcentaje podría ser algo superior si consideramos que los padres de muchos sujetos son aún jóvenes y no han desarrollado la enfermedad. También es interesante el hecho de que los hombres consuman dietas más ricas en carbohidratos y realicen menos actividad física y sin embargo la frecuencia de sobrepeso y riesgo por la RCC son menores que en las mujeres, lo cual puede ser debido a las diferencias hormonales.

Con relación a la tolerancia a la glucosa se encontró una frecuencia de intolerancia del 10 por ciento, siendo ésta más frecuente nuevamente en el sexo femenino (12.5 por ciento) que en el masculino (6.6 por ciento). Aunque no se ha reportado la frecuencia de intolerancia a la glucosa, estos resultados son similares a los reportados para DM2 en cuanto a la frecuencia tanto global como por sexos.

Para determinar las edades de mayor aparición de intolerancia a la glucosa, se agruparon los sujetos alterados por decenios y se encontró que la mayor frecuencia corresponde al grupo de edad de 20 a 29 años, seguido por el de 30 a 39, como puede observarse en la gráfica 2.



Estos resultados indican que la intolerancia a la glucosa se presenta principalmente entre los 20 y los 40 años, y podemos explicar la disminución en su frecuencia si consideramos que la DM2 se manifiesta por lo general a partir de los 30 años, de tal forma que es menos frecuente encontrar intolerancia en personas de mayor edad, pues en los que la presentaron, ésta pudo haberse desarrollado ya como DM.

Al relacionar las curvas alteradas con los diferentes factores de riesgo, el análisis de discriminantes mostró que existen diferencias significativas entre los individuos con curvas alteradas y normales ($P < 0.01$) considerando el conjunto de va-

riables analizadas, indicándonos los coeficientes estandarizados producto de este análisis que los factores de mayor peso son los antecedentes hereditarios, el sexo y la edad, y que los factores alcoholismo, tabaquismo y dieta no tienen una influencia importante como factores de riesgo en la población estudiada. A pesar de que el sobrepeso, el ejercicio y los demás factores no son los más importantes, adquieren relevancia cuando se relacionan con los antecedentes, el sexo y la edad, por lo cual es fundamental determinar si las personas presentan riesgo por éstos para llevar a cabo medidas que disminuyan ese riesgo y en consecuencia, el inicio de la enfermedad, como lo han propuesto diversos autores (Rivadeneira, 1970; Rimm, Manson, Stampfer *et al.*, 1988).

De acuerdo con nuestros resultados, el tener antecedentes hereditarios, ser mujer y menor de 40 años pueden ser considerados como los factores de más peso en la evaluación del riesgo de presentar alteraciones en la tolerancia a la glucosa.

BIBLIOGRAFÍA

- American Diabetes Association. "Screening for type 2 diabetes". *Diabetes Care*, vol. 23, supl. 1, 2000.
- Bjorntorp P. "Efficacy of training in obese diabetic patients". *Diabetes Care*, vol. 15, num. 11, 1992. Pp. 1783-1786.
- Bogardus C., Lillioja S. y Bennett P. "Pathogenesis of NIDDM in pima indians." *Diabetes Care*, vol. 14, num. 7, suppl. 3, 1991. Pp. 685-690.
- Cassano P., Rosner B. y Vokonas P. "Obesity and body fat distribution in relation to the incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a prospective cohort study of men in the normative aging study." *Am J Epidemiolog*, vol. 136, num. 12. Pp. 1474-1486.
- Ferrannini R. y DeFronzo A. "The association of hypertension, diabetes and obesity." A review. *J Nephrol*, vol. 1, 1989. Pp. 3-15.
- González-Villalpando C. y Stern M. "Prevalencia de la diabetes e intolerancia a la glucosa en una población urbana de nivel económico bajo". *Rev Inv Clin*, vol. 44, num. 3, 1992. Pp. 321-328.
- Haffner S., Mitchell B., Stern M. y Hasuda H. "Macrovascular complications in mexican americans with tipe II diabetes". *Diabetes Care*, vol. 14, num. 7, 1991. Pp. 665-671.
- Hamman R., Franklin G. et al. "Microvascular complications of NIDDM in hispanic and non hispanic whites. San Luis Valley Diabetes Study." *Diabetes Care*, vol. 14, num. 7, 1991. Pp. 655-664.
- Horton E. "Role of environmental factors in the development of noninsulin dependent diabetes mellitus". *Am J Med*, vol. 30, 1983. Pp. 33-41.

- King H. y Kriska AM. "Epidemiological considerations and study methods." *Diabetes Care*, vol. 15, num. 11, 1992. Pp. 1794-2004.
- Lau SH. ed. *Manejo médico de la diabetes no insulino dependiente (tipo II)*. Impreso con permiso de la American Diabetes Association, 1994.
- Motala A., Omar M. y Gows A. "High risk of progression to NIDDM in south african indians with impaired glucose tolerance." *Diabetes*, vol. 42, num.4, 1993. Pp. 556-63.
- O'Brein IAD. y Corral RM. "Epidemiology of diabetes and its complications". *N Engl J Med*, vol. 129, num. 9-10, 1988. Pp. 1619-20.
- Polly R. K. "Diabetes health beliefs, self-care behaviors and glycemic control among older adults with non-insulin-dependent diabetes mellitus." *Diabetes Educ*, vol. 18, num. 4, 1992. Pp. 321-327.
- Rimm E., Manson J., Stampfer M. et al. "Cigarette smoking and the risk of diabetes in women". *Am J Public Health*, vol. 82, num. 3, 1993. Pp. 211-214.
- Rios TJM. ed. "Epidemiología de la diabetes en México." *Consenso Funsalud*. Fundación Mexicana para la Salud. 1995.
- Rivadeneira J. *Curva de tolerancia a la glucosa*. Boletín terapéutico, IMSS, 1970.
- Saad M., Knowler W. et al. "Insulin and hypertension: relationship to obesity and glucose tolerance in pima indians." *Diabetes*, vol. 39, 1990. Pp. 1430-1435.
- Shima K., Shi K., Sano T., Iwami T., Mizuno A. y Noma Y. "Is exercise training effective in preventing diabetes mellitus in the Otsuka Long Evans Tokushima fatty rat a model of spontaneous non insulin dependent diabetes mellitus?" *Metabolis*, vol. 42, num. 8, 1993. Pp. 971-977.
- Stampfer M., Colditz G., Willett W. et al. "A prospective study of moderate alcohol drinking and risk of diabetes in women." *Am J Epidemiol*, vol. 128, num. 3, 1988. Pp. 549-558.
- Stern M., Knapp J., Hazuda H., Haffner S., Paterson J. y Mitchell B. "Genetic and environmental determination of type II diabetes in mexican americans: Is there a "descending limb" to the modernization/diabetes relationship." *Diabetes Care*, vol. 14, num. 7, 1991. Pp. 649-653.
- Stumvoll M., Mitrakou A. et al. "Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity" *Diabetes Care*, vol. 23, num.3, . Pp. 295
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. "Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus". *Diabetes Care*, vol. 21, supl. 1, 1998.
- Wilson P., Anderson K. y Kannel W. "Epidemiology of diabetes mellitus in the Elderly. The Framingham Study." *Am J Med*, vol. 89, suppl 5A, 1986. Pp. 3-9.
- World Health Organization. "Diabetes mellitus: report of a WHO study group Geneva". *World Health Organization tech rep ser*, num. 727, 1985. Pp. 9-17.

GENERAL ASPECTS OF THE *Polymerase chain reaction*

Ma. Teresa Mata,¹ Ricardo López Romero,² Genaro Patiño,³ María Dolores García Suárez,⁴ Héctor Serrano⁵

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una de las metodologías fundamentales utilizada en los laboratorios de biología molecular. A pesar de su sencillez teórica, en muchos casos las pequeñas variaciones aumentan los costos y dificultades. Una vez salvados los contratiempos y bajo condiciones estandarizadas, tiene múltiples aplicaciones. Aquí revisamos las necesidades generales a considerar cuando se trata de implementar la técnica en el laboratorio.

INTRODUCTION

Polymerase chain reaction (PCR), is a basic Molecular Biology technique developed in the mid 1980 by Kary Mullis, and because of his discovery, he was awarded in 1993 the Nobel Prize in Chemistry. This technique involves thermal cycles for the enzyme synthesis of a DNA segment. In the first step, and after a primer sequence binds to his complementary stretch in the DNA template chain, it is elongated by an enzyme. The last step in each cycle is termination due to the physical separation of the two strands of the DNA template. After several cycles of binding, elongation and termination, it is possible to obtain billions of copies of the segment in only a few hours. After the first publication in the scientific literature, there are an increasing number of papers using some variation of the basic technique. In the very same year that Mullis was awarded with the Noble prize, one of the most important multidisciplinary journals, Science magazine took the PCR as the most important discovery and the Taq polymerase enzyme as molecule of the year prophesizing the Nobel award to Mullis.

The technique is based in some global characteristics of the DNA replication process (Watson, et al., 1993). In *E. coli*, the replicative enzyme (DNA polymerase) uses a single stranded chain as template in order to synthesize the complementary chain after it is bound to a double stranded stretch produced by another enzyme, the DNA primase that

makes a short (30 to 50 nucleotides long) primer. In the natural process, the action of the replicating DNA polymerase is not restricted to a single gene but to a more larger zone called the REPLICON or replicative unit that is duplicated in a single replicative event. In vitro, the separation between primers determines the DNA segment that will be synthesized. This segment could be a single gene, part of it, or even the flanking regions that will control the extent of that gene is expressed.

THE FUNCTIONAL BASE OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION

Synthesis of a complementary strand gives after a PCR cycle two full length strands (the original template and the newly synthesized) in such a way that for the next cycle it actually begins with two template chains obtaining four chains at the end of the cycle and so on giving as a final theoretical result that after "n" cycles, the reaction tube will contain 2ⁿ double stranded DNA chains that are copies of the original DNA segment comprised between the two initial primers. The second important characteristic of PCR is that the amplification is highly specific. Initial reactants for a successful PCR amplification is DNA containing the sequence to be amplified. It is not necessary to isolate the segment to be amplified since it is actually defined by the chosen primers. The DNA amount to initiate the PCR amplification is quite low. Less than a microgram of total genomic DNA is enough to be used. A

¹ Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI, México

² Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México.

³ Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI, México

⁴ Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. Biología, Laboratorio de Micropropagación, México.

⁵ Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. Ciencias de la Salud. Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Fertilización, México.

classical PCR mixture includes the initiating primers complementary to the sequence to be amplified, the enzyme (DNA polymerase), a mixture of the four triphosphate nucleotides, and solutions that will maintain pH, ionic force and cofactor concentrations in a proper range for an optimal enzyme activity, as shown in table 1.

TABLE 1. Most commonly used concentrations in PCR. In all cases, it is taken from stock solutions. Always you have to determine the optimal concentrations of each component for a specific sequence to be amplified	
COMPONENT	FINAL CONCENTRATION
Enzyme buffer	20 mM Tris-HCl pH 8.4 with 50 mM KCl
MgCl ₂ (from a 50 mM stock solution)	1-4 mM
10 mM dNTP Mix	200 μM each nucleotide
Primers (forward and reverse)	0.2 a 1 μM
Template DNA	Plasmids:<0.1 ng Genomic: 0.05 a 1 μg
Enzyme	25 mU/μl reaction

Initially, the reaction was done by using DNA polymerases that were inactivated by the denaturing temperature as the DNA polymerase from *E. coli*, that from the T4 bacteriophage and the modified DNA polymerase of the T7 phage (7). But, since these enzymes were denatured when the temperature was raised up to 94°C in order to separate the two DNA strands it was necessary to add enzyme after each denaturation step. This detail made very expensive to proceed trough this approach so, if somebody will go to produce higher DNA amounts the only alternative was to use a thermostable DNA polymerase. Fortunately, Brock and Freeze in 1969 isolated an Archeobacteria named *Thermus aquaticus*, a microorganism capable to live and reproduce in hot waters at temperatures as high as 75°C. Ten years after the discovery of Brock and Freeze, Chien and co-workers isolated the thermostable DNA polymerase: Taq polymerase that has been the most widely know polymerase (mentioned in Gelfand, 1989). Even when is the most publicized thermostable DNA polymerase is far from being the only and by now there are many labs that uses a Taq clone instead of the native enzyme. One of the most remarkable characteristics of most DNA polymerases is their capacity to remove the last nucleotide he has incorporated into the nascent strand. If the local double helix topography is altered due to the incorrect spacing between the opposed nucleotides and if they do not form properly the interchain hydrogen bonds. This proofreading activity is called an exonuclease activity.

One of the main aspects we have to take care when we are looking for a DNA polymerase is related to his error rate.

Since one of the main goals when we are performing a PCR protocol is to obtain an error-free sequence, if the chosen DNA polymerase includes some mistakes, its utility is lower than other that includes only a few or no mis-incorporation per cycle. Also, the capability of the DNA polymerase to synthesize long segments is sometimes used as extra criteria for enzyme selection. Some of the most remarkable characteristics of the most widely used thermostable DNA polymerases are shown in table 2.

TABLE 2. Characteristics of some DNA polymerases most commonly used in PCR. In all cases, the enzymes were isolated from the archaeobacteria in parentheses and, except for KlenTaq, all are native not modified enzymes. NA= Not available				
Enzyme	MWr (10 ³ Daltons)	Errors (10 ⁶ bases)	Km (nt/sec/enz)	T optimal (°C)
Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)	94	285	150	72
KlenTaq (<i>Thermus aquaticus</i>) N-terminal deletion	NA	NA	230	72
Vent (<i>Thermococcus litoralis</i>)	NA	57	230-250	70-80
Pfu (<i>Pyrococcus furiosus</i>)	NA	20	230-260	70-90
Replinas (<i>Thermus flavus</i>)	NA	125	NA	70-80

PCR STEPS AND THE THERMAL PROFILE

A PCR cycle involves three different temperatures related to the phenomena we want to induce to the amplification mixture:

1. Denaturation. The goal of this step is to separate the two strands of the double helix. This is achieved by incubating the mixture at 94°C several minutes, depending of the sample origin and the use we will give to the amplified segment.
2. Alignment of the initiator primers. This temperature is the most variable of the whole thermal profile. It depends on the primer characteristics, mainly its base composition (GC content, length, and number of non-classical bases). In general, this step lasts from 30 seconds up to one minute and the most used temperatures are between 50 to 65°C.
3. Elongation step. During this step of the thermal cycle, the synthesizing activity of the DNA polymerase is make to the full. Temperature varies depending mainly of the chosen polymerase. We have to note that a higher temperature may damage the 3-dimensional structure of

the enzyme lowering its efficiency. Taq polymerase, for example is an enzyme that loses 10% of its activity when exposed to 64°C for times up to 40 minutes. At 110°C, on the other hand, Pfu polymerase has no loss in activity even after one hour at that temperature. Since most PCR labs use some kind of Taq polymerase, a good starting temperature for elongation is 72°C.

ADN for PCR is most of the times belonging to the genome of the cell after homogenization or from lysed bacteria. However, and except for DNA sequencing reactions, PCR do not need a highly purified DNA. We can use all liberated DNA obtained after we have dissolved the cell membrane. This method also can be used to study the expression pattern of a selected gene. Starting from the messenger ribonucleic acid (mRNA) contained by a group of cells under specific characteristics, it is possible to synthesize a complementary DNA (cDNA) by using a reverse transcriptase enzyme that uses the mRNA as template. This cDNA can then be used for PCR amplification.

DNA or RNA used as template for the amplification reaction can be obtained from several sources: from root hair cells, sperm cells or biopsies, even isolated DNA from pathology lab records, extinct animal or plant fossils can be used in this way (Hans, 1989). One main feature of PCR is its high sensibility since it can be amplified a single sequence can be amplified from a 10⁵-10⁶ cells. PCR products can be visualized by ethidium bromide stain in an agarose gel. Its length can also be deduced depending on the primer alignment separation (Hans, 1989).

Primer design is a very important feature in PCR since they do actually define the amplification region so it is important both its sequence as well as its concentration. Primer sequence usually has these characteristics:

- They are complementary to the extremes they will be attached to.
- They do not have to have tridimensional structures.
- They have to present a concentration balance between C+G and A+T. G+C content of a typical primer varies between 40 to 75%.
- Whenever it is possible, avoid one base repetition (eg, AAAA or GGGGG tracks).

Some of these characteristics have obvious connotations. If primers are the binding sites for the enzyme, they have to be coupled to the template chain and positioned in a proper way so the 3' OH termini has to be exposed toward the segment to be amplified. If there are some self complementarity in the primer sequence, or they do hybridize with each other, then if we add all reaction components we will have amplification even in the reaction lacks a template DNA since the complementary region of both primers can be elongated in opposite directions making the also known as "primer dimer" artifact.

Another aspect of the primer is regarding its base content. For

example, a sequence in which the G+C content is high, in order to be fully linearized, it has to be heated to a higher temperature than other primer that has the same length but its G+C content is lower than the former, as is shown in the next table.

PRIMER	SEQUENCE	G/C CONTENT	MELTING TEMP. (°C)
A	GCATCGATT CG AACTTA	7/18	55
B	GCAC CG ATT CG AACTTA	8/18	57
C	GCAC CG ATT CG AA C TA	9/18	59

In each case, the difference is only a substituted base (bold letters). However, that single substitution increases the melting temperature by 2°C. If the suggested primer length is 26 bases, 7 more than in our example, it is possible that the needed melting temperature is as high that will surpass the optimal temperature for the polymerase to work making difficult the proper result acquisition.

If the reaction is at suboptimal melting temperatures for alignment, the required specificity is lost since some primers are not fully available to interact with the target sequence and could be complementary to other DNA regions.

PCR APPLICATIONS

There are three main fields when PCR are used today. We will give only small examples in each field.

Human genetics

In this field, PCR is used to detect DNA fragments that are important for several diseases detected for prenatal diagnosis as is the case of muscular dystrophy when attending to the alterations of the dystrophin gene. It is possible to detect in a sample the alterations in the hot spots commonly found in the mature protein or the RNA maturing alterations usually associated to this disease. This diagnostic can be done in samples from the amniotic fluid from the fetus, the mother and sister of an affected individual in order to detect the possible transmitters of the defect gene and give a proper genetic advise.

Another example is the forensic identification working with samples from a dead corps or from physical evidences from a crime scene or suspects. In this case, since each individual has a unique genes array, it is possible to identify it from a set of samples by using genetic markers, mainly microsatellites that are amplified by PCR (Caetano, 1997).

As mentioned above, PCR amplification has also being used to show gene structural lesions as in Duchenne muscular dystrophy in individuals that are lacking some protein-coding region or even the lost of a intervening sequence (intron) that are responsible of a non-translatable messenger RNA as is the case of the lost of the exon I of the dystrophin gene. Less frequently, PCR has been used in human genetics for sex determination by amplifying the sex determining region in the Y chromosome: Sry.

Clinical investigation

Clinical uses of PCR are mainly focused to the detection and study of infectious diseases and Cancer. Acute lymphocytic leukemia and chronic myeloid leukemia are detected by PCR when they are the result of a chromosomal translocation (Holzer and Lazarus, 1997).

Biopsies of human cervical tissue have been used to detect one of the more than 50 different types of the human papilloma virus (HPV), the etiologic agent associated with the female cervical cancer. Hepatitis B virus can also be detected in serum samples.

Molecular biology

Applications in this field are focused mainly to gene cloning, gene and genomic library screening, to obtain the sequence both of some important gene as well as whole organism genomes including the human, fruit fly, mouse, worm and several microorganisms including the biochemists and molecular biologists work horse: *Escherichia coli*.

Basic gene research is not the only field when PCR has been applied. By using PCR in a well planned fashion, it is possible to change just one aminoacid from a determined protein and, in a similar way than the classical Physiologists in the classical times, see the functional alteration this change made; this can be called molecular functional protein mapping made by site-directed mutagenesis.

Most of the practical uses made with PCR are focused to molecular biology techniques such as the rapid probe preparation by amplification incorporating an specific nucleotide that has been labeled both chemically with biotin, or carrying some fluorescent label. These probes can be used in other techniques like hybridization (Southern and Northern blots), automated sequencing, or in situ hybridization.

PCR optimization

As mentioned above, a classical PCR amplification includes deoxynucleotides, specific primers complimentary to the target sequence a thermostable DNA polymerase, buffer and DNA. Even when there are variations in the enzyme buffer, it usually contains 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.4) and 1.5 mM MgCl₂. This last component shows the most variable effect on the reaction specificity. Optimal concentrations may depend on the amplified sequence and primer characteristics. Most of the cases use concentrations varying from 0.5 to 1.0 mM free Mg for genomic sequences. A typical 200 mM of each dNTP is enough to obtain results up to 20 µg DNA in a 100 µl reaction. Optimal conditions for a specific reaction varies depending on primer sequence, target sequence complexity, template integrity and, to a lesser extent, on the target concentration. Primer concentration varying from 1.0 to 1.0 µM gives results most of the times. Primer excess can lead not only to specificity loss but it can also permit artifactual amplification. Primer dimers are usually seen agarose gels as a strong band in the range equivalent to the sum of the primer length. Enzyme

concentration in a 100 µl reaction PCR is typically 2 U even when we can obtain some results in the 1 to 4 concentration range.

Regarding to the amplification cycle optimization, this refers to the temperatures and time the reaction spent in each one. Insufficient denaturation due to less than 90 °C is a common failure source. As we noted earlier, primer G+C content determines the annealing temperature. In optimizing the annealing temperature a 50 to 60 °C is a good starting point for 20 bp primers containing 50% G+C. Conditions such as 93 °C 15 to 30 seconds for denaturation, alignment at 55 °C for 15 to 30 seconds and primer extension at 72 °C, are the most used thermal profile when used all mentioned reactants described above (Mullis, 1989; Saiki, 1989).

PCR VARIANTS

Asymmetric PCR

This variation is used when single strand amplification is required, as is the case of single strand sequencing. The basic procedure is used but primer concentrations are not equal differing in a 100 factor toward the strand it is used as template and, even when amplification is only linear, there are enough DNA is synthesized to be used in a sequencing gel.

Reverse PCR (RT-PCR).

RNA-based DNA synthesis is done previous to DNA amplification. This step is performed by using an RNA based DNA polymerase or reverse transcriptase. This enzyme synthesizes DNA reading the sequence of a RNA template. As in the case of DNA polymerases, this enzyme needs a primer in order to bind the DNA-RNA hybrid.

There are some reverse transcriptases isolated from retroviral sources. The most commonly used are those isolated from Avian myeloblastosis Virus- infected cells and those from the Moloney Murine Leukemia virus-infected mouse cells. This two enzymes has also an intrinsic RNase activity that, after DNA synthesis cuts the RNA moiety leaving a sort of primer that is then used for the DNA polymerase as binding points.

An alternative is to use a novel DNA polymerase that under certain experimental conditions such as the presence of Mn²⁺ ions show a reverse transcriptase activity: the thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* (Tth). If there is a quelating agent in the buffer such as EGTA, and in a second reaction are added enough Mg²⁺ ions, then the enzyme acts as a DNA polymerase.

In any case, the most usual primer template for the reverse transcription is either oligo (d) T or small (six base long) primers with no specific sequence. These two primers permit the alignment to the polyA tail that is common to most of the eukaryotic messengers RNAs (mRNA) in the first or to other internal sequences in the case of the random hexamers.

If there are gene specific primers in the double strand DNA synthesis, then the complimentary DNA is suitable to be

amplified or cloned. RT-PCR is used mainly in gene cloning and, depending to the strategy; it can be directly cloned into prepared plasmid or phage vectors. However, this PCR variant is also used as a technique to analyze the differential expression of one specific gene has in a certain tissue under some experimental condition. It is also used as a quantitative expression tool if in the mixture is incorporated a quasi-similar primer that could compete with the gene specific primer (Galindo, et al., 1997).

PCR CONTAMINATION

False positives can be obtained as a contamination by product. This false positive signal can be due to exogenous material contamination or contamination by the very same DNA sequences runs in a routine assay. To avoid these problems, all materials that could be used in PCR are sterilized in order to inactivate the enzymes capable to degrade our DNA during isolation or handling. All buffers deionized water, pipette tips, and microfuge tubes are autoclave sterilized.

Physical separations of the manipulation areas are highly recommended. At least three different working areas should be designated: a sample preparation or pre-PCR area, the amplification or PCR area properly; and the analysis section or post-PCR area. There have to have enough amounts of material and specific solutions that have to be used in each respective area that are not shared in between. As we shall see, Physical separation and good working behavior in each area is of main importance to obtain reproducible and confident results in amplification work.

In the sample preparation area, that usually are the common area of the laboratory, the initial steps of DNA preparation are done, usually is the sacrifice area if the sample is obtained from living animals. Care should be taken in avoiding to use the pre-PCR area as the place when the oligonucleotides are synthesized since if there is a contamination in the DNA source with the same primers we will use, then it is possible that our reaction will not work or if it works, the results are not so good as should be. One strategy to avoid this source of contamination is to share with another groups the oligo synthesis facility or to order the primer synthesis outside the Institution.

The pre-PCR zone is the restricted zone where both the last steps in DNA purification as well as stock solutions, except primers, are prepared. This zone has to be separated by a physical barrier by Plexiglas and has to have all required substances to have an adequate manipulation. Again, good laboratory practices allow in the control of all undesirable variables reducing the chance of an error. There are some commercially available restricted zones (clean room) that fits almost all required necessities. They also have an ultraviolet source that can destroy any previously handed DNA.

The PCR zone should be provided with all sterile solutions

and material and in adequate amount in order to perform a clean manipulation. Usually this zone is ultraviolet light irradiated in order to destroy any contaminating DNA that can be generated by the aerosol produced during a non-careful micropipette manipulation. By using positive displacement pipettes or barrier trapped tips, aerosol contamination is drastically reduced. In this zone it is usually located the PCR machine so good space and connections in this zone are required.

The post-PCR zone is dedicated to the analysis and resolution of the amplification products. As in all previous zones, here we have to have all required reagents and materials to obtain good quality results. In this zone, it is highly desirable to have a DNase free environment but it is necessary to monitor this area looking for some health risks due to the use of radioisotopes or mutagenic and theratogenic agents like Ethidium bromide or other intercalating reagents commonly used to visualize the amplification products.

Good laboratory practices are, for example to make small amount aliquots of concentrated solutions to avoid the repetitive use of the full reagents. Glove use and constant change as well as wearing a clean laboratory coat and, in the PCR zone a frequently washed lab coat, reduces the chances to contaminate our samples with degrading enzymes or undesirable external or between sample contamination (Kitchin *et al.*, 1990; Kwok and Higuchi, 1989).

CONCLUDING REMARKS

Even when there is not an error prone rule that secure the successful in the set up, optimization and routine operation of the PCR amplification technique, all described general rules described gives at least to have a general, logical and simple scenario in order to distinguish and to detect the most common error sources for a first time PCR laboratory. It was not our idea to give an encyclopedic knowledge of the PCR technique but to give some insights of the problems we usually found when setting up the routine work. Several good reviews can be found on the web such as those listed below:

<http://www.lifetechnologies.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.org/Entrez>

REFERENCES

- Caetano-Anollés, Gustavo. "Nucleic acid scanning by amplification with mini-hairpin and microsatellite oligonucleotide primers". In: Caetano-Anollés, G., and Gresshoff, P.M. (Eds) *DNA Markers. Protocols, Applications and Overviews*. New York: Wiley-Liss, 1997. Pp. 91-113.
- Galindo, José E., Poirier, G.M.C., Guo, H., Huvar, A., Wagaman, P.C., Zhu, J., Tench, J., Wan, J.S., and Erlander, M.G. "Differential display of RNA". In: Caetano-Anollés, G.,

- and Gresshoff, P.M. (Eds) *DNA Markers. Protocols, Applications and Overviews*. New York: Wiley-Liss, 1997. Pp. 225-236.
- Gelfand, D.H. "Thermus aquaticus DNA polymerase". In: Erlich, H., Kazazian H.H. and Gibbs R. (eds.), *Current Communications in Molecular Biology. "Polymerase Chain Reaction"* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Hans, P.V. "The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids". *Hum. Genet.* 83, 1989. Pp 1-15.
- Holzer, Timothy, J., and Lazarus, H. "Amplification. The detection of rare events and Oncology." In: O. Bagasra and J. Hansen, (eds.). *In situ PCR Techniques*. New York: Wiley-Liss, 1997. Pp. 119-127.
- Kitchin, P.A., Szotyori, Z., Fromholc, C., and Almond, N. "Avoidance of false positives." *Nature* 344, 1990. Pp. 201.
- Kunkel, T.A., and Eckert, K.A. "Fidelity of DNA polymerases used in polymerase chain reactions". In: Erlich, H., Kazazian H.H. and Gibbs R. (eds.), *Current Communications in Molecular Biology. "Polymerase Chain Reaction"* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Kwok, S. and Higuchi, R. "Avoiding false positives with PCR". *Nature* 339, 1989. Pp. 237-238.
- Mullis, Kary B. "The polymerase chain reaction: Why it work". In: Erlich, H., Kazazian H. H. and Gibbs R. (eds). *Current Communications in Molecular Biology. "Polymerase Chain Reaction"*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Saiki, R. K. "Optimization of the polymerase chain reaction". In: Erlich, H., Kazazian H.H. and Gibbs R. (Eds) *Current Communications in Molecular Biology. Polymerase Chain Reaction*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Watson, James D., Gilman, M., Kitkowski, J., and Zoller, Y *Recombinant DNA*. Second Edition. New York: Sci. Am. Books, 1993. Pp. 79-98.

LA COMUNICACIÓN

Química en los organismos

Jesús Montemayor, Mohammed Badii, Adriana Flores y Carlos Aguilera¹

La vida animal tiene una exigencia fundamental, la de percibir lo más finamente posible las múltiples características y variaciones del medio ambiente. Para ello, han aparecido progresivamente en el curso de la evolución, desde los protistas hasta los vertebrados, organismos sensibles a las numerosas sustancias químicas que se transportan en el agua y el aire, o receptivos a la presión, la temperatura, la luz y los sonidos.

INTRODUCCIÓN

Los humanos captamos la mayoría de la información a través de la vista y los sonidos. Estos son nuestros mejores órganos sensoriales, pero para muchos organismos el mundo es muy diferente, y para ellos las señales químicas son la fuente principal de información. Es por esta razón, que especies tan diferentes como la mosca y el elefante dependen de la habilidad de detección de señales químicas para su sobrevivencia.

A las sustancias químicas cuya recepción está implicada en las relaciones entre los organismos se denominan semioquímicas (tabla 1). Las feromonas, al igual que los aleloquímicos forman parte de éstas. La particularidad de las feromonas es que inducen respuestas intraespecíficas y se dividen en *disparadoras* o *inductoras*, dependiendo del tiempo en que tarda en presentarse el efecto y su implicación en la fisiología del organismo receptor. Contrariamente los aleloquímicos, al ser secretados por individuos de una especie al medio ambiente, pueden ser percibidos por organismos de una especie diferente (respuesta interespecífica). Los aleloquímicos a su vez se dividen en *alomonas*, *kairomonas* y *sinomonas* en función del beneficio que pudiera obtener el organismo emisor, el individuo receptor o ambos respectivamente (Takahashi, 1982; Bauchau y Fontaine, 1984).

Funcionalmente las feromonas, como se dijo anteriormente, permiten a los animales de la misma especie identificar a los congéneres con los cuales se van a aparear y a sus competidores alimenticios (Dunham *et al.*, 1997), mientras que los aleloquímicos son utilizados para evitar a los depredadores o a las presas potencialmente peligrosas e identificar el ambiente adecuado para desarrollarse.

TABLA 1
Definición de las moléculas secretadas al medio ambiente por organismos acuáticos (tomada de Bauchau y Fontaine, 1984).

SEMIOQUÍMICAS		
FEROMONAS Intraespecíficos	ALELOQUÍMICOS Interespecíficos	SINOMONAS Beneficio para ambos organismos.
INDUCTORAS Efecto retardado que modifica la fisiología del organismo receptor. – Maduración – Inhibición – Agregación – Territorio	DISPARADORAS Efecto inmediato reversible sobre el comportamiento del organismo receptor. – Alarma – Sexual – Agregación – Territorio	ALOMONAS Beneficio para el organismo emisor.
KAIROMONAS Beneficio para el organismo receptor.		

En la presente revisión se enlistan ejemplos de cómo actúa la comunicación química en los diferentes grupos de seres vivos.

COMUNICACIÓN QUÍMICA EN ALGAS

Las grandes masas del alga café *luminaria digitata* en las costas del norte del Atlántico son las formas asexuales de esta alga. En su forma sexual liberan esporas microscópicas llamadas gametofitos. Los gametos de los hembras (huevos) liberan una feromona que atrae a los gametos masculinos (es-

¹ Doctores-Investigadores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Correo electrónico respectivo: jmontema@ccr.dsi.uanl.mx; mbadii@ccr.dsi.uanl.mx; caguiler@ccr.dsi.uanl.mx

perma). Una vez que ocurre la fusión de gametos, el cigoto pierde su capacidad de atraer a otros gametos machos (Muller *et al.*, 1971). El embrión producido mediante esta unión puede crecer dentro de las hojas espesas y el tallo de la forma asexual. En este caso el mensajero y el receptor de los mensajes feromonales son sólo dos células capaces de dar origen a un organismo completo (Muller, 1989).

COMUNICACIÓN QUÍMICA EN HONGOS

El hongo *Allomyces* crece sobre plantas o animales en ríos, estanques o lugares húmedos. Su ciclo de vida es complicado ya que involucra fases de reproducción sexual y asexual. Una fase de su existencia consiste de formas con gametangias, las cuales son estructuras llenas de gametos (tanto masculinos como femeninos). Cuando la gametangias son cubiertas por agua, liberan los gametos a través de pequeños poros situados en sus paredes. Ya en el medio acuático, la función de las células masculinas y femeninas es la de juntarse en pares, fusionarse y formar un cigoto, constituyendo así una nueva generación dentro del ciclo de vida. En la unión de las células participa activamente una feromona liberada por los gametos femeninos. Esta hormona es conocida como *Sirenin*. Además existe evidencia de la presencia de una feromona masculina que atrae a los gametos femeninos. Dicha feromona se purificó parcialmente y se denominó *Parisin* (Pommerville, 1981).

COMUNICACIÓN EN INSECTOS

Varias son las formas que usan los insectos para comunicarse, por ejemplo sonidos, luz, sustancias químicas, etc., que les permiten realizar varias de las actividades normales para la supervivencia, alimentación y reproducción. Sustancias producidas por ellos mismos o detectadas de otros organismos son ejemplos de ello. Actualmente se conocen cientos de dichas sustancias, las cuales han sido clasificadas en grupos diferentes (Jacobson, 1972).

Abejas mielíferas

Una sociedad de abejas mielíferas (*Apis mellifera*) tienen habitualmente una población de 30 mil a 40 mil obreras y una reina adulta. Las reinas son criadas en celdas especiales que tienen mayor tamaño que las celdas ordinarias y tienen una forma semejante a la de la cáscara de un cacahuete. Aunque todos los huevos tienen un potencial genético para producir reinas, las nuevas reinas aparecen sólo en ciertas épocas y bajo circunstancias específicas. De acuerdo con algunas evidencias, las reinas se transforman en tales gracias a una dieta generalmente más nutritiva en su estado larvario, especialmente rica en proteínas (Free, 1987).

La reina ejerce influencia en sus súbditos por medio de las feromonas, de las cuales parece haber varias. La influencia de una de las feromonas, la sustancia real, inhibe el desarrollo de los ovarios de las abejas obreras y evita que se transformen

en reina o que produzcan reinas rivales. Si una colmena pierde a la reina, las obreras notarán su ausencia muy rápidamente y se agitarán. Poco después comenzarán a agrandar las celdas de los obreros para formar celdas de emergencia para reinas y las larvas, en las celdas agrandadas, alimentadas con la dieta especial, cualquier larva diploide tratada de esa manera se transformará en reina (Wheeler & Eickwort, 1984).

COMUNICACIÓN EN CRUSTÁCEOS

Las hembras de jaiba azul, *Callinectes sapidus*, liberan una feromona sexual cuando ellas se encuentran en etapa receptiva. Esto representa una ventaja evolutiva ya que la feromona es liberada a través de la glándula de la orina, cuando la hembra se encuentra en la etapa blanda (recién mudada) atrae a un macho, quien detecta la feromona por medio de las células receptoras presentes en sus antenas, para que la proteja de ser depredada y tiempo después, generalmente 2 ó 3 días, se lleva a cabo la cópula (Gleeson *et al.*, 1987).

El cortejo en esta especie involucra una secuencia de comportamientos que se extienden por varios días, comenzando con la percepción de las feromonas sexuales por parte del macho, quien en ese instante exhibe un comportamiento de cortejo distintivo que se caracteriza por la extensión de las quelas en una posición lateral, extensión de los apéndices locomotores (del segundo al cuarto pereiópodo) y movimientos rítmicos laterales de los apéndices natatorios (quinto pereiópodo).

En respuesta, la hembra permanece pasiva o se mueve alrededor del macho hasta colocarse debajo de él. El macho entonces abraza a la hembra, lo que puede durar varios días, hasta que la hembra muda completamente y se lleva a cabo la fecundación (Bauchau, 1986; Gleeson, 1991).

COMUNICACIÓN EN PECES

El papel quimiosensorial y los sistemas de señales químicos en los peces pueden estar limitados, pero se han hecho adelantos dramáticos en el estudio de las feromonas sexuales desde 1980 (Liley, 1982). El estudio más amplio describe un sistema feromona hormonal en la carpa dorada. Una revisión de los avances desde una perspectiva, coloca a la carpa dorada como un modelo. Estos estudios determinan las hormonas sexuales y el papel que controla la fisiología reproductiva y la conducta de la carpa dorada.

Los peces parecen ser capaces de reaccionar selectivamente a la percepción olfativa y gustativa de sustancias (aminoácidos derivados de esteroides biliares y sexuales, etc.) producidos por determinados organismos, congéneres, presas y depredadores, y de sustancias procedentes del medio. Estas respuestas comportamentales son desencadenadas por concentraciones muy pequeñas de compuestos activos del orden del nanogramo por litro (Stacey *et al.*, 1994).

Por ejemplo el atún (*Thunnus albacares*) aumenta su velo-

idad de natación en respuesta a una dosis de 10 moles por litro de triptófano, aminoácido presente en el extracto de sus presas. En la trucha arcoiris, el fluido ovárico de la hembra atrae a los machos a concentraciones de 0.1 mg /l.

Durante los tres últimos decenios, el desarrollo de las técnicas de análisis ha permitido aportar una multitud de información sobre el origen, la identidad y el papel comportamental de sustancias químicas en los peces. Además, este campo de investigación presenta un gran interés para el desarrollo de la acuicultura, la puesta a punto de métodos de pesca más selectivos y el control de los desplazamientos de las poblaciones en el medio natural.

Todos los peces estudiados hasta ahora emiten feromonas sexuales en el momento de la reproducción. La primera demostración convincente de este hecho la aportó Tavolga (1956) con el pez globo (*Bathygobius saporator*), pez de las zonas litorales del oeste del África y del este del Pacífico. Este investigador constató que una corriente de agua procedente de un acuario que contiene una hembra que está ovulando, induce, en los segundos siguientes, el comportamiento de cortejo del macho (efecto incitador). Posteriormente, este efecto se ha observado en una cuarentena de especies muy diferentes desde el punto de vista del comportamiento y de la clasificación.

Las feromonas liberadas por las hembras de Guarami azul (*Trichogaster trichopterus*), inhiben la agresividad de los machos e incrementan en éstos las actividades de construcción del nido, el cual se realiza con burbujas de aire, aglomeradas con una secreción bucal (Degani & Schreiberman, 1993). De hecho, la comunicación química entre los peces se revela muy compleja, ya que la actividad de las feromonas sexuales puede depender de las características de acondicionamiento social de los progenitores.

Las feromonas sexuales de los peces influyen tanto en la aparición y la sincronización de las actividades reproductoras masculina y femenina y además participan en la regulación de las densidades de población de los padres. En la mayoría de los casos, el ovario es el principal lugar de producción de la feromona sexual de la hembra. Esta sustancia se emite con el fluido ovárico durante la ovulación en las especies ovíparas (que es el caso más común), y justo después del nacimiento de los jóvenes en las especies ovovivíparas estudiadas (poecílicos). En los machos, la feromona puede ser producida por los testículos (gobidos), la vesícula seminal (claridos) y en algunos casos por glándulas situadas sobre el cuerpo del pez (blenidos, caracidos) (Bardach & Todd, 1970).

COMUNICACIÓN EN ANFIBIOS

Se sabe poco acerca de feromonas de anfibios. Se ha descubierto y caracterizado una feromona que atrae hembras, la cual es secretada de las glándulas parótidas de la rana macho. Esta feromona, la cual se ha denominado espiendiferina, es la primera feromona de un anuro en ser identificada. Las glándu-

las de la piel de los anuros secretan diferentes compuestos, incluyendo péptidos biológicamente activos. Por ejemplo *L. espléndida* exuda varios péptidos de las glándulas parótidas y rostral (situados en la parte trasera y frontal de la cabeza, respectivamente) incluyendo el amplio espectro antimicrobial. Sin embargo no se han reportado feromonas de anuros aparte de una posible feromona de alarma en el renacuajo del sapo *Bufo bufo*.

COMUNICACIÓN EN REPTILES

La poca información disponible sobre feromonas en reptiles (víboras y lagartijas), se refiere al movimiento rápido de la lengua de estos organismos, lo cual presumiblemente les ayuda a recibir señales químicas. La detección se lleva a cabo por medio de un prominente órgano llamado órgano vomeronasal (Crews & Garstka, 1982).

La serpiente roja *Thamnophis sirtalis* parietalis posee una feromona que permite a los machos reconocer a las hembras. Como ya se mencionó, en este caso también interviene un rápido movimiento de la lengua de los machos, la cual transfiere las señales feromonales de la hembra hacia el órgano vomeronasal (Mason & Crews, 1986).

COMUNICACIÓN EN AVES

La evidencia de la presencia de feromonas en las aves está incompleta y sólo se han estudiado pocos casos. Los machos del pato *Anas platyrhynchos* sufren una considerable inhibición del comportamiento sexual después de que se le seccionó el nervio olfatorio, sugiriendo esto que el olfato juega un papel importante en el proceso de reproducción (Wenzel, 1986). Interesantemente la composición de la secreción de la glándula uropygial cambia durante la temporada de reproducción, por lo que existe la posibilidad de que esta glándula sea una fuente de *atractantes* sexuales u otras señales reproductivas.

COMUNICACIÓN EN MAMÍFEROS

Los mamíferos pueden percibir las señales químicas a través de sus órganos olfativos o del órgano vomeronasal presente en una gran variedad de ellos. Las señales químicas son liberadas generalmente mediante secreciones y excreciones; particularmente importantes sin las orinas, heces y productos de glándulas en la piel; las señales sirven para atraer al sexo opuesto, delimitar el territorio, alarma, etc.

Las especies de mamíferos más estudiadas con respecto a la presencia de feromonas son los roedores, principalmente los hámsters (*Mesocricetus aureus*). Cuando las hembras están receptivas, liberan feromonas a través de descargas vaginales (Melrose *et al.*, 1971). Los machos de esta especie que no pueden detectar las señales químicas fallan para responder ante las hembras receptivas (Murphy, 1973).

FEROMONAS EN EL HUMANO

En la actualidad existen compañías que ofrecen a la venta “poderosos” perfumes creados a partir de feromonas, los cuales ayudan a las personas a atraer al sexo opuesto. Las campañas publicitarias las realizan generalmente en revistas populares y últimamente por Internet. Los *slogans* publicitarios aseguran que el éxito de algunas personas hacia el sexo opuesto no es más que una sobredosis de feromona que secreta naturalmente. Un ejemplo de este tipo de publicidad se presenta a continuación:

“No se frustre si otra persona consigue siempre obtener al sexo opuesto, sabiendo que usted es tan bueno como él o ella. Quizás esa persona tiene una super abundancia de feromonas. Las feromonas son olores químicos naturales que el cuerpo produce para atraer el sexo opuesto. Estas se utilizan por todo el reino animal y en los humanos no es tan diferente. Muchos competidores ofrecen feromonas que se extraen de cerdos o monos. Nosotros tenemos fragancias que aromáticamente son los atrayentes sexuales más poderosos”.

VENTAJAS DEL CONOCIMIENTO DE LA COMUNICACIÓN QUÍMICA

Desde hace más de dos décadas se están aprovechando los conocimientos adquiridos sobre la comunicación química con la finalidad de desarrollar nuevas herramientas y estrategias para minimizar el daño a las cosechas, reducir los riesgos a la fauna como resultado de las prácticas agrícolas e industriales, y mejorar la efectividad de productos utilizados para la atracción o repelencia de especies importantes a nivel ecológico y/o comercial (Shorey, 1976).

Un ejemplo de lo anterior son las larvas del lepidóptero *Heliothis zea* y *H. virescens* que constituyen una de las plagas más destructivas de la agricultura en los Estados Unidos, ya que atacan al algodón y a las plantas de tabaco, entre otros cultivos y además, causan pérdidas en el maíz y la soya, totalizando casi mil millones de dólares por año.

Actualmente se les controla por completo con insecticidas, con la desventaja que estos causan la muerte de otras especies de insectos, incluyendo aquellos que se alimentan del género *Heliothis*, es decir, los depredadores de estas plagas.

Otro ejemplo es el ocurrido en Estados Unidos, cuando se utilizó un método alternativo para controlar a los insectos dañinos con el uso de feromonas sexuales para llevar a los machos hacia su muerte. En 1982 los científicos del Departamento de Agricultura estaban experimentando con feromonas sexuales sintéticas, buscando compuestos que atrajeran a las larvas del macho de *H. virescens* a trampas o que bloquearan sus receptores de modo que no pudiesen encontrar hembras receptoras. Mientras los científicos estaban probando una de estas feromonas en el campo, descubrieron que era particularmente efectiva de un modo inespecífico, ya que engañaba tanto a los machos de *H. zea* como a los machos de *H. virescens*.

Lo que resultó aún más sorprendente, ya que propiciaba que los machos de la primera especie cruzaran la barrera específica y se aparearan con hembras de otra especie.

Al haber fallado al primer mecanismo de aislamiento por causa de engaño y la instintiva de los científicos, se encontró un segundo mecanismo, los miembros de la segunda especie difieren en la forma de sus genitales, estas diferencias minúsculas no evitan la copulación, pero una vez que se lleva a cabo no pueden separarse nuevamente, de tal manera queda atrapado en un abrazo mortal. Los entomólogos del Departamento de Agricultura fueron cautos, pero encontraron en este “caos sexual” un método efectivo de control de insectos.

Como estos, existen una gran cantidad de ejemplos que demuestran la importancia en el conocimiento de la comunicación química entre los organismos de todas las clases, ya sea para el control biológico de plagas (Takahashi, 1982), como para asegurar la reproducción de especies de importancia tanto comercial como ecológica.

REFERENCIAS

- Bardach, J. E. & J. H. Todd . “Chemical communication in fish”. In: *Communication by chemical signals*. Edited by J. W. Johnston, D.G. Mouton & A. Turk. New York: Appleton-Century-Crofts, 1970.
- Bauchau, A. G. “Sex pheromones in crustacea”. *Elsevier Science Publishers B.V. Advances in invertebrate reproduction* 4. M. Porchet, J.C. Andries and A. Dhainaut editors, 1986. Pp. 337-243.
- Bauchau, A. G. & M. T. Fontaine. “Chemoreception et comportement de reproduction chez crustacés”. *Oceanis*. 10(2), 1984. Pp. 151-168.
- Crews, D. & W. R. Garstka. “The Ecological physiology of Garter Snake”. *Scientific American*, 247, 1982. Pp. 159-168.
- Dunham, D., K. A. Ciruna & H. H. Harvey. “Chemosensory role of antennules in the behavioral integration of feeding by the crayfish”. *Cambarus bortoni. J. of Crustacean Biology*, 17(1), 1997. Pp. 27-32.
- Free, J. B. *Pheromones of social bees*. London: Chapman & Hall, 1987.
- Gleeson, R.A., M. A. Adams & A. B. Smith. “Characterization of a sex pheromone in the blue crab, *Callinectes sapidus*: Crustecdysone studies”. *Journal of Chemical Ecology* 10(6), 1984. Pp. 913-921.
- Gleeson, R. P. “Intrinsic Factors Mediating Pheromone Communication in the blue crabs, *Callinectes sapidus*”. In *Crustacean sexual biology*. Edited by T. Bauer and J.W. Martin. New York: Columbia University Press, 1991.

- Jacobson, M. *Insect sex pheromones*. New York: Academic Press, 1972.
- Liley, N. "Chemical communication in fishes". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 39, 1982. Pp. 22-35.
- Mason, R. & D. Craws. "Pheromone mimicry in Garter Snakes". In *Chemical Signals in Vertebrates*. Edited by D. Duvall, D. Muller-Schwarze & R.M. Silverstein, New York: Plenum Press, 1986.
- Melrose, D. R., H. C. Reed & R. L. Patterson. "Androgen steroids associated with boar odour as an aid to the detection of oestrus in pig artificial insemination". *Br. Vet. J.* 127, 1971. Pp. 497-501.
- Muller, D. G., L. Jaenicke, M. Donike & T. Akintobi. "Sex attractant in a brown algae: Chemical structure". *Science* 171, 1971. Pp. 815-817.
- Muller, D.G. "The role of pheromones in sexual reproduction of brown algae". In: *Algae as experimental systems*. Edited by A. W. Coleman et al. New York: Alan R. Liss, 1989.
- Murphy, M. R. "Effects of female hamster vaginal discharge on the behavior of male hamsters". *Behav. Biol.* 9, 1973. Pp. 367-375.
- Pommerville, J. "The role of sexual pheromones in Allomyces". In: *Sexual interactions in Eukaryotic Microbes*. Edited by D. H. O'Day and P. A. Horgan. New York: Academic Press, 1981.
- Shorey, H. H. *Animal communication by pheromones*. New York: Academic Press, 1976.
- Stacey, N., W. Zheng & J. Cardwell. "Milt production in common carp (*Cyprinus carpio*): stimulation by a goldfish steroid pheromone". *Aquaculture* 127, 1994. Pp. 265-276.
- Tovolga, W. N. "Visual, chemical and sound stimuli as cues in the sex discriminatory behavior of the gobiid fish *Bathygobius soporator*". *Zoologica* 41, 1956. Pp. 49-64.
- Wenzel, B. M. "The ecological and evolutionary changes of procellariform Olfaction". In *Chemical signals in vertebrates*. Edited by D. Duvall, D. Muller-Schwarze & R.M. Silverstein. New York: Plenum Press, 1986.
- Wheeler, J. W. & G. C. Eickwort. "Semiochemicals of bees". In *Chemicals ecology of insects*. Edited by W.J. Bell & R.T. Cardé. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 1984.

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE AGARITA (*BERBERIS TRIFOLIATA MORIC*) UN Arbusto nativo del desierto chihuahuense

Francisco Molinar,¹ Wayne A. Mackay,² Marisa M. Wall,³ Joaquín Rodrigo García⁴ y Manuel Cárdenas⁵

Diversos experimentos fueron llevados a cabo para desarrollar un protocolo de propagación clonal de agarita (Berberis trifoliata moric). Retoños en pleno crecimiento fueron colectados de una planta madura en el Centro de Investigación y Extensión de la Universidad Texas A&M en El Paso. Los retoños fueron establecidos exitosamente en medio basal para plantas leñosas (WPM) y vitaminas Murashige y Skoog, 30g L⁻¹ de sacarosa y Fitoagar al 0.8% suplementado con 11.1 µM BA. Las pruebas incluyeron la aplicación de citokininas (benzyladenina, kinetina y thidiazuron), período de subcultivo y edad de los cultivos. Las condiciones óptimas para la proliferación de los retoños fueron medio basal WPM suplementado con 5.5 BA y un período de subcultivo de cuatro semanas. La edad de los cultivos no afectó la proliferación de los nuevos retoños pero sí su capacidad para producir raíces. Los experimentos preliminares con 11.1 µM NAA resultaron en casi un 100% de enraizamiento de los retoños con menos de seis meses en el medio de cultivo. Los brotes con 21 meses en WPM tuvieron que ser colocados en medio libre de citokininas para tener un enraizamiento exitoso. Asimismo, el 68% de los brotes produjeron raíces en medio basal suplementado con NAA (5.4 µM), resultando en un promedio de 1.2 raíces secundarias por brote. Los nombres químicos utilizados son: N-(phenylmethyl) 1H purin-o-amina (BA); 1-acido naftalenoacetico (NAA); N-phenyl-N-1,2,3-thidiazol-5ylurea (thidiazuron o TDZ); 6 furfulaminopurina (kinetina).

La agarita es un arbusto perenne que alcanza hasta 2 metros de altura en condiciones naturales. La planta se desarrolla en medio ambiente árido y suelos alcalinos como los que constituyen el desierto chihuahuense. Asimismo, agarita es una opción económicamente viable para usos ornamentales en zonas áridas, ya que está bien adaptada a las condiciones climatológicas adversas (Cross y Wiederman, 1983). La corteza contiene un alcaloide llamado berberilaurina, el cual es utilizado por los nativos de Chihuahua, Nuevo México y Arizona para curar enfermedades relacionadas con la sangre (Weber y LeRay, 1992).

Las poblaciones nativas propagadas por semilla presentan características y variaciones no deseables en aspectos como morfología de las hojas, color y forma. Plantas superiores seleccionadas presentan características deseables tales como coloración brillante perenne, hojas con terminación puntiagu-

da, apariencia densa, flores y frutos de color atractivo y resistencia a la sequía y enfermedades. Sin embargo, agarita es difícil de enraizar utilizando técnicas tradicionales y por lo tanto puede ser propagada solamente por semilla con las consiguientes variaciones genéticas no deseadas (Nokes, 1986).

La propagación *in vitro* (micropropagación) permite la multiplicación rápida y en gran escala de clones superiores y por tanto, el potencial para aumentar la producción comercial y el establecimiento de plantas de élite en lugares donde el suministro de agua y labores culturales son una limitante. La propagación de otra especie de agarita (*Berberis thunbergii* DC) ha sido reportada con éxito utilizando BA para inducir la proliferación de retoños. El enraizamiento de estos retoños se llevó a cabo en medio de cultivo libre de auxinas después de un periodo de inducción de siete días en completa oscuridad con IAA o 1H-acido indole-3-butirico (IBA) (Karhu y Hakala,

¹ Doctor en filosofía, investigador nacional, profesor de ecología de zonas áridas, Departamento Pecuario, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua. El primer autor pertenece al área de Biología Experimental y recibe sus comentarios en: fmolinar@uacj.mx

² Doctor en filosofía, investigador residente, laboratorio de biotecnología, Centro de Investigaciones y Extensión Agrícola de la Universidad de Texas A&M, Dallas.

³ Doctor en filosofía, profesor de horticultura, New Mexico State University, Las Cruces.

⁴ Doctor en bromatología, profesor e investigador titular de bromatología, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

⁵ Doctor en filosofía, profesor emérito de estadística, New Mexico State University, Las Cruces.

PALABRAS CLAVE: propagación clonal, agarita, medio de cultivo, fitohormonas.

1991). El objetivo de nuestra investigación fue desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de un genotipo superior de agarita, examinando las variables que afectan la proliferación, crecimiento y enraizamiento de los retoños.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento y cultivo de los explantes

Se recolectaron durante el verano brotes apicales en crecimiento activo de 2 cm de longitud de una planta de élite madura y en etapa de floración, localizada en el Centro de Investigación y Extensión de la Universidad de Texas A&M en El Paso. Después de la separación de las hojas, los brotes fueron desinfectados por 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (10 % clorox®) en agitación constante, y 0.1% Tween 20 (v/v) como surfactante. Posteriormente los brotes fueron enjuagados tres veces con agua destilada esterilizada y cortados con bisturí a = 1.5 cm de longitud para cultivarse en medio basal. Se requirió de un período corto de transferencia temporal (3 días) después del primer subcultivo para eliminar los compuestos fenólicos producidos después del primer corte. En esta ocasión, el uso de carbón activado no fue necesario para remover los compuestos fenólicos del medio de cultivo.

Medio de cultivo

Consistió en medio basal para plantas leñosas (WPM), sales inorgánicas (Lloyd y McCown, 1980), vitaminas de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), 30 gL⁻¹ de sacarosa, y Fitoagar al 0.8 % (Sigma tipo A). Asimismo, el medio basal fue suplementado con 11.1 µM de BA. para el establecimiento de los brotes. El pH fue ajustado a 5.7 antes de ser llevado al autoclave por 20 minutos a 121°C. El medio fue posteriormente repartido en tubos de ensayo de 25 x 140 mm y cubiertos con tapas de plástico (Bellco Kaputs, Vineland, NJ). Los cultivos fueron establecidos en cámaras de crecimiento con 18± 2°C de temperatura y fotoperíodos de 16 horas bajo luz blanca fluorescente (≈ 50 µM.m⁻²s⁻¹).

Mantenimiento de los cultivos

Los cultivos fueron transferidos cada cuatro semanas a frascos de 55 x 70 mm conteniendo el medio de cultivo descrito anteriormente y cerrados herméticamente con tapaderas de plástico (Magenta B-caps; Magenta Corp., Chicago). Los experimentos se iniciaron una vez que se obtuvo el número suficiente de brotes. Los explantes iniciales fueron de 1.5 cm. Para subcultivos posteriores, los explantes provenientes de los brotes se cortaron a -0.5 cm de longitud.

Proliferación de los brotes-experimento 1

Durante este experimento fue evaluado el efecto de las citokininas en el desarrollo y mantenimiento de los cultivos. Las citokininas probadas fueron kinetina, TDZ y BA. Los brotes (de 0.5 cm de largo) provenientes de los cultivos des-

critos anteriormente fueron sembrados en medio basal suplementado con kinetina (5.8, 11.6, 23.2, 46.0 µM), TDZ (0.005,0.05,0.23, 0.45 µM) o BA (5.5, 11.1, 22.2, 44.0 µM) resultando en 12 tratamientos. Tres brotes (submuestras) fueron colocados en cada frasco con 5 frascos (repeticiones) por tratamiento.

Efecto de la edad de los cultivos-Experimento 2

Con la finalidad de probar si la producción de brotes axilares declina con la edad de los cultivos, los brotes fueron cosechados a partir de cultivos con 30 meses de edad y colocados en medio suplementado con 11.1 µM de BA, y posterior al experimento 1 (proliferación de los brotes), transferidos a medio con 5.5 µM de BA. Los cultivos de ocho meses se multiplicaron y mantuvieron en medio con 5.5 µM de BA. Esta concentración fue la óptima, identificada en el experimento 1. Se establecieron un total de 15 frascos (repeticiones) con tres explantes cada uno (submuestras) para cada tratamiento.

Efecto del periodo de subcultivo en el crecimiento de los brotes-Experimento 3

Los brotes de 1.5 cm de largo fueron cosechados de los cultivos con 30 meses de edad. Los brotes se transfirieron inmediatamente al medio basal conteniendo 5.5 µM de BA para la realización de los experimentos sobre el efecto de la duración del cultivo. Los tratamientos consistieron en cuatro períodos (4, 6, 8 y 4+4 semanas). En los primeros tres tratamientos los brotes fueron cosechados y medidos a las 4, 6 y 8 semanas respectivamente. En el cuarto tratamiento (4+4), los brotes fueron transferidos a medio fresco sin remover los brotes axilares después de las primeras cuatro semanas en cultivo. Los brotes fueron cosechados y medidos después de cuatro semanas más (ocho semanas en total). Tres brotes (muestras) fueron sembrados en cada frasco con 15 frascos (repeticiones) por tratamiento.

Enraizamiento-experimento 4

Para el experimento de enraizamiento, los brotes se obtuvieron de cultivos con 21 meses de edad en medio con 5.5 µM de BA. Posteriormente, los brotes se colocaron en un medio libre de citokininas durante 30 días antes de ser transferidos al medio experimental de enraizamiento conteniendo IBA o NAA. Los nueve tratamientos de enraizamiento fueron los siguientes: un control (sin auxinas), IBA en concentraciones de (0.5, 5.4, 13.4 y 26.81 µM). Tres brotes (submuestras) fueron sembrados en cada frasco (55 x 70 mm) con cinco frascos (repeticiones) por tratamiento. Los explantes fueron cultivados posteriormente bajo las condiciones descritas previamente.

Proceso de aclimatación

Los brotes enraizados se sembraron en recipientes Magenta GA7 (Magenta Corp) conteniendo medio RediEarth (W.R. Grace, Cambridge, Mass). Las plantas se sometieron a desarrollo en cámaras de crecimiento a temperaturas de 18± 2°C

bajo lámparas de luz blanca Sylvania GroLux (Sylvania, Westfield, Ind; 70 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Las plantas fueron irrigadas semanalmente utilizando una solución de fertilizante líquido previamente esterilizado. Al existir raíces visibles a través de la superficie interior de los recipientes GA7 (2 a 4 semanas) se realizó un período de aclimatación previa y se trasladaron a condiciones de invernadero. Por último, fueron resembradas en macetas estándar de plástico y colocadas dentro de una cámara de rocío por un período de una semana. Después de la aclimatación en la cámara de rocío, las plantas fueron llevadas a condiciones normales de invernadero, seguido por un proceso de transferencia a campo bajo sombreaderos de plástico difuso y finalmente fueron plantadas en el campo.

Registro de datos y análisis estadístico

Las variables consideradas para el experimento 1 (proliferación de brotes) fueron: largo del brote principal, número de brotes axilares, y largo de los brotes axilares. Durante el enraizamiento, las variables analizadas fueron: largo de la raíz primaria, número de raíces secundarias y largo de las raíces secundarias. Las raíces fueron medidas en milímetros después de remover los explantes del medio de cultivo. Los explantes de prueba son destruidos al disectar la parte aérea y las raíces formadas. Se utilizó un diseño completamente al azar para analizar los resultados de todos los experimentos. Los datos fueron probados utilizando un análisis de varianza dentro del programa S.A.S. (Instituto S.A.S., Cary, NC). La separación de medias se llevó a cabo con la prueba de Tukey de diferencia máxima significativa (DMS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proliferación de brotes-experimento 1

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para la variable largo de la raíz principal (en un rango de 5.6 a 6.7 mm). Sin embargo, encontramos diferencias significativas para el número de raíces axilares (tabla 1). En general, la máxima respuesta de proliferación de brotes axilares resultó con el tratamiento suplementado con BA, aunque no fue diferente a la concentración más baja de TDZ, o a la concentración más alta de kinetina. En las diferentes concentraciones probadas con reguladores de crecimiento, la kinetina fue la menos efectiva para la proliferación de brotes.

Los brotes obtenidos en los tratamientos con TDZ, tuvieron una apariencia pobre, con decoloraciones en la porción basal y con concentraciones más altas de antocianinas en las hojas. Al evaluar la respuesta y cualidades de los brotes, la concentración de 5.5 μM de BA fue seleccionada como mejor tratamiento ya que produjo el mayor número de brotes con mejor calidad. Asimismo, es de tomarse en cuenta que la utilización de concentraciones menores de BA produjeron los mejores resultados. Las tasas de propagación *in vitro* de agarita fueron más altas que aquellas reportadas para *Berberis thunbergii* DC. (Karhu y Hakala, 1991). En nuestro trabajo, la

TABLA 1

Efecto de la kinetina, thidiazuron (TDZ), y benzyladenina (BA) en el número de brotes axilares de agarita.	
Cytokina (μM)	Número de brotes axilares
Kinetina	
5.8	1.3 cb ^z
11.6	1.1 cb
23.2	1.4 cb
46.0	1.8 a-c
TDZ	
0.005	2.6 a-c
0.050	2.1 a-c
0.230	0.6 c
0.450	0.7 c
BA	
5.5	3.8 a
11.1	3.0 ab
22.2	3.0 ab
44.0	2.2 a-c

^z Separación de medias con la prueba de Tukey de diferencia mínima significativa (LSD), $P < 0.05$.
Los valores de las medias provienen de 10 repeticiones (frascos) conteniendo tres submuestras (explantes o brotes) por frasco.

dominancia apical fue determinante y la decapitación no fue necesaria para lograr la multiplicación de brotes axilares. Las tasas de proliferación de agarita en nuestro estudio fueron del doble comparadas con aquellas obtenidas en *B. thunbergii* DC con decapitación. Durante más de tres años de subcultivo de agarita, la multiplicación de brotes no declinó. Estos resultados son similares a los obtenidos en otra leñosa *Ulmus pumila* L., en los cuales las tasas de multiplicación se mantuvieron en aumento durante dos años de subcultivos continuos cada cuatro semanas (Corchete *et al.*, 1993).

Efecto de la edad de los cultivos-experimento 2

Los cultivos de 30 y de ocho meses de edad respectivamente, respondieron de manera similar para los tres criterios evaluados (largo del brote principal, número de brotes axilares y largo de los brotes axilares) durante los 30 días en el medio de cultivo (datos no mostrados).

Efecto del periodo de subcultivo en el crecimiento de los brotes-experimento 3

El largo de los brotes axilares no fue afectado por la duración del período de subcultivo. Asimismo encontramos diferencias mínimas entre tratamientos para la variable largo del brote principal y para la variable número de brotes axilares. El largo del brote principal tuvo un rango de 6.5 mm en seis semanas y de 7.3 mm en ocho semanas y no se incrementó en períodos

más largos de subcultivo. El número de brotes axilares no fue diferente entre los períodos de cuatro, seis y ocho semanas. El tratamiento de 4+4 semanas dio un promedio de 5.2 brotes axilares. Esto representa un incremento significativo sobre el período de ocho semanas (3.5 brotes), pero no fue diferente a los períodos de 4 o 6 semanas. Por consiguiente, el período de subcultivo de cuatro semanas fue seleccionado como el mejor porque produjo el mayor número de brotes en un tiempo relativamente corto.

Enraizamiento-experimento 4

Los experimentos preliminares con 1.0 μM de NAA resultaron en casi 100 por ciento de enraizamiento en brotes provenientes de cultivos < de 6 meses (datos no mostrados). Sin embargo, los resultados de los experimentos para enraizamiento de brotes con 21 meses en cultivo demostraron que la capacidad para producir raíces de calidad se ve afectada gradualmente por la duración del tiempo en cultivo.

En experimentos iniciales con estos cultivos sólo el dos por ciento de los brotes enraizaron. Las raíces iniciales aparecieron después de tres semanas en cultivo (datos no mostrados). El pobre enraizamiento de los brotes cosechados de cultivos con más tiempo podría ser el resultado de la acumulación residual de BA en el sistema vascular de los explantes.

El enraizamiento fue exitoso en experimentos en los cuales se efectuó un período de subcultivo libre de citoquinas antes de la transferencia de los brotes a medio de cultivo con auxinas. Esos brotes en medio con 4.9 μM de IBA, 12.3 μM de IBA, o 5.4 μM de NAA tuvieron porcentajes de enraizamiento de 79%, 67 % y 68% respectivamente (Tabla 2). Los brotes provenientes del control, IBA (0.5 μM) y NAA (26.8 μM) no produjeron ninguna raíz primaria y por lo tanto no fueron considerados para el análisis estadístico.

Por otra parte, los brotes que enraizaron formaron una sola raíz primaria con longitudes de 1.2 a 18 mm., la cual se ramificó formando diversas raíces secundarias. Aunque no existieron diferencias entre tratamientos para las variables: largo de la raíz primaria o número de raíces secundarias, el tratamiento con 5.4 μM de NAA fue seleccionado como el mejor, considerando los resultados obtenidos para las variables (porcentaje de enraizamiento, 68%) y largo de la raíz primaria (18 mm) y secundarias (4.0 mm). Este tratamiento fue utilizado en lo sucesivo para enraizar los brotes; posteriormente las plantas fueron sujetas al proceso de aclimatación y transferencia a condiciones naturales, con niveles de sobrevivencia en el campo >95%.

A diferencia de *B. thunbergii* D.C., donde el enraizamiento fue iniciado bajo un período de oscuridad, agarita produjo

TABLA 2

Efecto del ácido naftalenoacético (NAA) y ácido indolebutírico (IBA) en el enraizamiento de los cultivos de agarita.

Auxina (μM)	Enraizamiento (%)	Largo de las raíces Secundarias (mm)
IBA		
4.9	79	1.9 ab ^z
12.3	67	3.1 ab
24.6	40	5.9 a
NAA		
0.5	17	0.7 ab
5.4	68	4.0 ab
13.4	20	0.1 b

^z La separación de medias se realizó con la prueba de Tukey de la más alta diferencia significativa, $P < 0.05$.

Los valores de las medias provienen de 10 repeticiones (frascos) conteniendo tres submuestras (brotes o microexplantes) por frasco. Los brotes dentro del control IBA (0.5 μM), y NAA (26.8 μM) no produjeron raíces y por lo tanto fueron excluidos del análisis.

raíces bajo lámparas fluorescentes. El decremento en la habilidad de agarita para producir raíces difiere grandemente de otras especies de leñosas. Por ejemplo, los explantes de durazno (*Prunus persica* L. Batch.) incrementan su capacidad de enraizamiento conforme permanecen más tiempo *in vitro*. (Hammerschlag *et al.*, 1987).

Otra diferencia notable en los patrones de enraizamiento de agarita con otras plantas, es la formación de una sola raíz primaria con varias raíces secundarias como soporte, en lugar de múltiples raíces provenientes de la base de los brotes o microexplantes.

CONCLUSIONES

El mejor protocolo para la propagación de agarita fue medio basal para leñosas WPM con 5.5 μM de BA, y un período de subcultivo de cuatro semanas con tres brotes por frasco. Otros resultados obtenidos indican que es conveniente establecer nuevos cultivos cada verano. Los beneficios de lo anterior son: 1) se obtienen mayores porcentajes de enraizamiento; 2) se requieren menores concentraciones de auxina en brotes con menor tiempo en cultivo; 3) no es necesario establecer un período de subcultivo libre de hormonas antes de iniciar el enraizamiento y finalmente: 4) es más fácil, en términos de contaminación por patógenos, establecer nuevos cultivos cada año.

BIBLIOGRAFÍA

- Corchete, M. P., J. J. Diez, and T. Valle. "Micropropagation of *Ulmus pumila* L. from mature trees". *Plant Cell Rpt.* 12, 1993. Pp. 534-536.
- Hammerschlag, F. A., G. A. Bauchan, and R. Scorza. "Factors influencing in vitro multiplication and rooting of peach cultivars". *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 8, 1987. Pp. 235-242.
- Karhu, S. T. and K. H. Hakala. "Micropropagation of *Berberis thunbergii* DC". *Acta Hort.* 289, 1991. Pp. 119-120.
- Lloyd, G. B. and B. H. McCown. "Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot- ip culture". *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30, 1980. Pp. 421-427.
- Murashige, T. and F. Skoog. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures". *Physiol. Plant.* 15, 1962. Pp. 473-497.
- Nokes, J. *How to grow native plants of Texas and the Southwest*. Austin: Texas Monthly Press, 1986.

ANÁLISIS CON CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS DIFERENTES TIPOS DE TIMOCITOS EN

Ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia

Rocío Ortiz Muñiz,¹ Leticia Cortés Martínez,² José Luis Gómez Olivares,³ Cristina González Torres,⁴ Edith Cortés Barberena⁵

La desnutrición se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, para el estudio de los efectos causados por ella los modelos en animales han sido de gran utilidad. El timo es esencial para el desarrollo de los linfocitos T además, se ha observado que es muy sensible a la privación nutricional.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si en el timo de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia se alteran las proporciones de las diferentes subpoblaciones de timocitos. Se obtuvo el timo de ratas de 21 días de edad, se identificaron por medio de citometría de flujo los diferentes subtipos celulares, detectando simultáneamente los marcadores de superficie CD4 y CD8. Los resultados muestran un incremento en las células dobles negativas (CD4- CD8-) y una disminución de las dobles positivas (CD4+ CD8+) en el timo de las ratas desnutridas. Sin embargo, las subpoblaciones simples positivas CD4+ y CD8+ presentan valores similares en ambos grupos de animales. Las alteraciones observadas podrían ser causadas por deficiencias de nutrimentos en el microambiente del timo, esenciales para la diferenciación de los timocitos y/o para la regulación del proceso de eliminación celular selectivo por apoptosis.

Además, el incremento en los timocitos dobles negativos probablemente implica fallas en la maduración temprana.

Estos aspectos deben continuar estudiándose.

DESNUTRICIÓN

La nutrición es un factor importante durante toda la vida de los organismos. Cuando la dieta es deficiente, principalmente por una ingestión y/o utilización de alimento con bajo contenido de proteínas, se presenta la desnutrición tan ampliamente distribuida en el mundo, con una alta prevalencia en los países pobres en donde se está incrementando debido a la pobreza, el desempleo y la ignorancia (De Mello, 1994).

La desnutrición se presenta con mayor frecuencia en los niños, en ellos sus efectos pueden ser particularmente adversos, ya que en los primeros años de la vida es cuando el crecimiento corporal se da rápido y los requerimientos de nutrimentos son mayores. Sin embargo, también surge en etapas posteriores, asociada muy frecuentemente a padecimientos como el sida y cáncer.

La desnutrición se ha clasificado en tres grados: leve, mo-

derada y grave, basándose en diferentes indicadores, dentro de los que se consideran principalmente: el déficit de peso, de talla o de la relación peso/talla con respecto a lo esperado para la edad cronológica del organismo (Cravioto y Vega-Franco, 1995). La desnutrición de tercer grado, conocida también como desnutrición calórico proteica (DCP) o severa, es la forma extrema del padecimiento, en ella el organismo ha agotado casi todas sus reservas, se presentan daños somáticos, funcionales e incluso psicológicos.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los avances sobre el conocimiento y tratamiento para una gran variedad de enfermedades, se han logrado a partir de las investigaciones realizadas en animales de laboratorio. Aunque estos modelos de estudio no son perfectos, significan una excelente herramienta para el estudio de diferentes pade-

¹ Doctora en ciencias. Biología Celular y Genética. Correo electrónico: arom@xanum.uam.mx

² Bióloga experimental. Biología Celular y Genética. Correo electrónico: letycortes@yahoo.com

³ Doctor en ciencias. Bioquímica y Biología Molecular. Correo electrónico: gool@xanum.uam.mx

⁴ Maestra en ciencias. Biología Celular y Genética. Correo electrónico: mcgt@xanum.uam.mx

⁵ Maestra en ciencias. Biología Celular y Genética. Correo electrónico: cobe@xanum.uam.mx

cimientos, y permiten probar terapias potenciales (Señor, 1995).

Para el estudio de los efectos causados por la desnutrición, los modelos en animales de laboratorio han sido de gran utilidad, pues ofrecen la facilidad de controlar varios factores extranutricionales que afectan al humano, además permiten realizar estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Galler y Kanis, 1987). Los experimentos se han realizado principalmente en ratas y ratones (Ortiz *et al.*, 1996). Se ha estudiado el efecto en diferentes campos como son: bioquímico (Skulman *et al.*, 1994), celular (Betancourt *et al.*, 1992), citogenético (Veena y Murthy, 1994; Ortiz y Betancourt, 1990; Ortiz *et al.*, 1995), conductual (Yoshino *et al.*, 1994) y neurológico (Cintra *et al.*, 1994).

Se ha evaluado el efecto de la desnutrición en diferentes etapas de la vida, desde la prenatal hasta la vejez. Se ha establecido que la lactancia es un periodo crítico en el crecimiento y desarrollo del organismo, en ella, las alteraciones por falta de nutrimentos son más graves en relación con las observadas en adultos (Winick y Noble, 1966; Fló *et al.*, 1991). Incluso se ha observado que los daños causados por ella son irreversibles (Veena y Murthy, 1994; Alu y Murthy, 1993).

En el aspecto inmunológico se han observado alteraciones en la funcionalidad de los componentes relacionados en la inmunidad mediada por células, así como deficiencias en los niveles de complemento sérico y la actividad fagocítica (Chandra, 1980). Es probable que la deficiencia nutricional produzca anomalías en los diferentes mecanismos de defensa. El análisis de las células encargadas de la respuesta inmune y el estudio de los mecanismos inmunorreguladores pueden dar la clave de las interacciones entre la nutrición e inmunidad en el hombre y en los modelos animales (Ortiz *et al.*, 1999; Feledi *et al.*, 1993; Benedetti *et al.*, 1992; Chandra, 1980). También se ha observado que la desnutrición tiene un fuerte impacto en el tamaño de los tejidos linfoides, particularmente, sobre el timo más que otros órganos (Prentice, 1999).

TIMO

El timo es fundamental para la inmunidad adquirida, ya que crea anticipadamente una defensa hacia una segunda invasión por un microorganismo al que se ha estado expuesto, se le considera menos esencial para la inmunidad innata. Además, el timo es básico para el desarrollo de los linfocitos T, provee el microambiente especializado para la maduración de las células T; para la generación de las diversas colecciones de receptores de las células T; y para la selección negativa de los linfocitos autorreactivos (Yang y Bell, 1993).

El timo es un órgano linfoepitelial, constituido mayoritariamente por linfocitos, y en una menor cantidad de células epiteliales y algunos macrófagos y células dendríticas. Una manera útil de investigar el desarrollo de las células T es delimitando las subpoblaciones de células del timo (timocitos), y analizando su aparición durante las distintas etapas de su diferenciación y maduración (Surh y Sprent, 1994; Scollay y Godfrey, 1995; Hiramine *et al.*, 1996).

En los roedores, las primeras células hematopoyéticas colonizan al timo en las primeras dos semanas de gestación. En cada una de las distintas etapas de maduración de los linfocitos T, se da la expresión de receptores membranales, mismos que sirven como marcadores de diferenciación (CD). Las células precursoras expresan el antígeno Thy-1, pero carecen de moléculas superficiales muy específicas, CD4 y CD8 (timocitos doblemente negativos) (Levinson y Jawetz, 1993). Hacia la tercera semana de gestación, aparece una nueva subpoblación de timocitos que expresan CD4 y CD8 (timocitos dobles positivos), y posteriormente, al final de la tercera semana, se presentan timocitos que expresan CD4 o CD8, conformando los fenotipos de células maduras; que reciben el nombre de timocitos positivos para un solo marcador (simples positivos). Al nacimiento, las proporciones de diferentes subpoblaciones de timocitos están estables; 5 por ciento corresponde a dobles negativos, 80 por ciento suponen dobles positivos y 15 por ciento corresponden a un solo marcador (maduros) CD4+ (linfocitos cooperadores) y CD8+ (linfocitos T citotóxicos).

En la primera semana de edad posnatal, el timo alcanza su tamaño máximo, y además ocurre una disminución exponencial en el número de células en la región cortical (Bar-Dayán y Small, 1994), debido al proceso de muerte celular programada, o apoptosis (Bar-Dayán *et al.*, 1999).

De acuerdo con la maduración de los timocitos, aquellos que son doblemente negativos, se les considera precursores de los timocitos doblemente positivos y de las células T maduras, en tanto, que los timocitos con doble marcado positivo constituyen una fase intermedia en el proceso de diferenciación. Está plenamente establecido que la mayoría de los timocitos doblemente positivos mueren en el timo por apoptosis (eliminación clonal), y su digestión es por macrófagos y células nodrizas del timo (Surh y Sprent, 1994; Hiramine *et al.*, 1996). Para abandonar el timo, los timocitos deben cumplir una serie de requisitos. Las células que logran realizar su propósito, son aquellas que expresan receptores antigénicos específicos y funcionales, además deben ser autotolerantes, capaces de reconocer antígenos asociados con las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad del individuo (Levinson y Jawetz 1993).

CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el estudio de las células se han desarrollado técnicas analíticas complementarias que logran aportar información esencial. La citometría de flujo ha surgido como una metodología fundamental y eficaz para la detección específica de una gran variedad de características estructurales y funcionales de células. Desde hace aproximadamente 10 años que esta metodología está relacionada con avances importantes en la investigación de la biología celular, inmunología, genética, oncología, etc.

La citometría de flujo se define como una tecnología que permite la evaluación simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. Estas mediciones se hacen mientras

las células pasan en una sola fila, a una velocidad de 500 a cuatro mil células por segundo a través del citómetro en una corriente de fluido. Las ventajas que proporciona esta metodología en relación con otros métodos que emplean fluorocromos incluyen: la objetividad, elevada sensibilidad y velocidad de análisis, posibilidad de realizar análisis simultáneos en una sola célula y separación celular en los “sorters”. Las desventajas y limitaciones son los altos costos del instrumento y la incapacidad de visualizar las células que estamos analizando.

ANÁLISIS DE DIFERENTES TIPOS CELULARES

Los leucocitos y linfocitos presentan una gran cantidad de moléculas marcadoras en su superficie, algunas de las cuales aparecen momentáneamente en etapas particulares de la diferenciación o de la activación celular. Las proteínas marcadoras de membrana pueden usarse para distinguir a las diferentes poblaciones celulares y muchas de ellas pueden ser identificadas por medio de anticuerpos monoclonales específicos (Parnes, 1987; Hannel *et al.*, 1992). El desarrollo de estos anticuerpos, conjugados con diferentes fluorocromos, y que pueden ser analizados por medio de citometría de flujo, ha revolucionado y propiciado grandes avances en el análisis de diferentes subpoblaciones de linfocitos. Así, la citometría de flujo ha emergido como una herramienta importante y poderosa en la identificación de diferentes poblaciones celulares.

En el timo la citometría de flujo ha sido muy útil para identificar cada una de las distintas etapas de maduración de los linfocitos T, esto es, para reconocer las diferentes subpoblaciones de timocitos y detectar las alteraciones en su diferenciación en diversos padecimientos (Roux *et al.*, 1989; Morris *et al.*, 1997).

El estudio de los diversos tipos celulares se puede efectuar con la detección de una sola fluorescencia (un solo color), pero ha resultado más eficiente y en algunos casos, fundamental el ensayo de diferentes colores, empleando dos o más fluorescencias. Así, se han perfeccionado los análisis, incrementando la precisión de los estudios.

El objetivo del presente trabajo fue identificar por medio de citometría de flujo las diferentes subpoblaciones de timocitos en ratas de 21 días de edad y determinar si en el timo de ratas con desnutrición grave se altera la proporción de estos subtipos celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratas de la cepa Wistar producidas en el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa que cuenta con un lugar especial para esta especie, con luz controlada 12 h luz/oscuridad, temperatura de 22 a 25°C y humedad relativa de 45 por ciento. Las madres fueron de segundo parto, criadas con alimento balanceado para roedores marca PMI 5001 y agua filtrada ad libitum, mantenidas en cajas de acrílico, con cama especial para roedores marca Betachips.

Los procedimientos utilizados se desarrollaron de acuerdo a las guías aprobadas institucionalmente (Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa), basadas en la guía del National Institute of Health (NIH) para uso de animales de experimentación (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 1985).

DESNUTRICIÓN EXPERIMENTAL

La desnutrición se indujo por el método de competencia de alimento durante la lactancia. Las ratas, al día siguiente de su nacimiento, se distribuyeron en dos lotes: lote experimental (desnutridas), en el que se colocaron 15 crías con una nodriza, y lote testigo (bien nutridas), con seis o siete crías por nodriza. Se formó una camada de cada tipo en cada ocasión. El cambio de madre, realizado al día siguiente al nacimiento de las crías y el número diferente asignado a cada madre fue bien aceptado por ellas. Se procuró tener en ambos grupos el mismo número de hembras y machos por camada. Las crías fueron pesadas cada 2 o 3 días, desde el día uno hasta el día 21 (destete). Se consideraron con desnutrición grave o de tercer grado, cuando presentaron un déficit de peso corporal mayor del 40 por ciento. Además, las ratas con desnutrición grave mostraron otros signos, como pelo escaso, fragilidad en los huesos y poca actividad motora, semejantes a lo observado en niños con condiciones nutricionales similares.

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO

DE LAS CÉLULAS DE TIMO

A los 21 días, nueve ratas de diferentes camadas fueron sacrificadas con una sobredosis de éter. Se analizó simultáneamente en cada experimento el timo de una rata bien nutrida y de una desnutrida de tercer grado.

Se les extrajo el timo, las células se obtuvieron homogeneizando el órgano y filtrando a través de una malla de 85 mmm., las células disgregadas fueron resuspendidas en solución salina de fosfatos libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (PBS; Microlab, México). La suspensión celular se incubó en oscuridad, a baja temperatura durante 30 min, con 5 µl de dos anticuerpos monoclonales conjugados con dos diferentes fluorocromos: Cy-chrome y ficoeritrina. El uso de estos anticuerpos permite la cuantificación simultánea de las diferentes subpoblaciones celulares, por medio del análisis directo de dos-fluorescencias.

Los anticuerpos empleados específicamente para rata fueron: CD4 (OX-35) conjugado con Cy-chrome (Cy-chrome™ conjugate mouse anti-rat CD4 monoclonal antibody, PharMingen International) para la identificación de linfocitos T4 y el anticuerpo CD8a (OX-8) conjugado con ficoeritrina (8R- Phycoerithrin R-PE conjugate mouse anti-rat CD8a monoclonal antibody, PharMingen International) para reconocer a las células T8.

ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO

Se utilizó un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson, Immunocytometry System (BDIS), CA, EUA) equi-

pado con un láser de argón (488nm), el cual fue preparado para el análisis de las muestras, para ello se emplearon perlas de calibración (Becton Dickinson) y el software FACSCOMP. De esta forma se verificó el ajuste de los detectores, se comprobó la discriminación adecuada entre las dos fluorescencias empleadas y la sensibilidad del equipo.

La obtención de los datos se realizó empleando el software CELL Quest (BDIS). Se adquirieron diez mil eventos de cada muestra. El análisis de los resultados se hizo empleando el programa de computación mencionado. Los resultados fueron analizados en gráficas de punto (dot plot). En la Figura 1 se presenta un ejemplo representativo de las gráficas de punto obtenidas y se indican los cuadrantes analizados. Los cuales fueron definidos de acuerdo a un control negativo y a la tinción con una sola fluorescencia.

En cada muestra se identificaron cuatro tipos de células: CD4⁺ CD8⁺ (dobles positivas, para las dos fluorescencias); CD4⁻ CD8⁻ (dobles negativas, para las dos fluorescencias); CD4⁺ CD8⁻ (simples positivas, sólo para la fluorescencia de CD4); y CD8⁺ CD4⁻ (simples positivas, sólo para la fluorescencia de CD8).

Con los porcentajes de los diferentes tipos celulares obtenidos en cada rata, se calcularon el promedio y la desviación estándar para cada grupo de ratas. Las comparaciones entre los porcentajes obtenidos en las ratas bien nutridas y las desnutridas fueron analizadas estadísticamente con la prueba de t de Student.

RESULTADOS

El peso promedio de peso corporal de las ratas de ambos grupos al día siguiente a su nacimiento fue de 7.6 ± 0.8 g. A los 21 días (día del destete) el promedio de peso corporal fue de 24.9 ± 3.9 g para las ratas desnutridas y 54.9 ± 7.6 g en el caso de las ratas bien nutridas. Las ratas desnutridas presentaron un déficit de peso de 55 por ciento, que refleja que presentaban desnutrición grave o de tercer grado. Los pesos de las ratas de ambos grupos se presentan en el Cuadro 1.

La Figura 2 es una fotografía que ilustra la disminución del timo observada en las ratas con desnutrición.

En la Gráfica 1 se presentan los porcentajes de timocitos CD4⁺CD8⁺ (dobles positivos) observados en cada una de las ratas de ambos grupos. En la Gráfica 2 se indican los datos de las células CD4⁻ CD8⁻ (dobles negativas). En las Gráficas 3 y 4 se muestran los valores de las subpoblaciones CD4⁺ (simples positivas) y CD8⁺ (simples positivas) respectivamente.

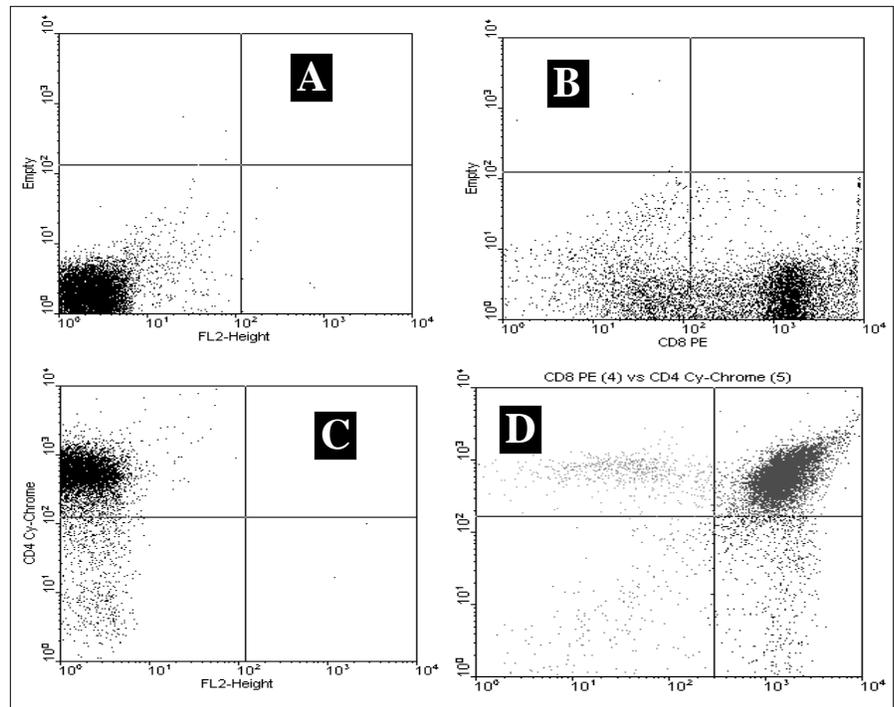


Figura 1: Gráficas de puntos (dot plot) representativas del análisis de los datos. **A:** Control negativo para las dos fluorescencias. **B:** Control de tinción sólo para una fluorescencia (PE), identificación de células CD8. **C:** Control de tinción sólo para Cy-Chrome, detección de células CD4. **D:** Tinción simultánea con las dos fluorescencias que permite distinguir cuatro subtipos celulares: dobles positivos, dobles negativos, simples positivos CD4 y simples positivos CD8.

En el Cuadro 2 se presentan, para su comparación, el promedio y la desviación estándar de cada subpoblación de timocitos obtenido para el grupo de las ratas bien nutridas y para el grupo de los animales con desnutrición.

El porcentaje promedio de timocitos CD4⁺CD8⁺ (dobles positivas) fue de 69.2 ± 3.4 en las ratas bien nutridas y 61.6 ± 7.9 en las desnutridas, en cuanto a las células CD4⁻ CD8⁻ (dobles negativas) los valores fueron 4.2 ± 1.6 y 8.5 ± 4.6 respectivamente, en el caso de los linfocitos CD4⁺ CD8⁻ (simples positivas, sólo CD4⁺) los porcentajes promedio fueron de 15.4 ± 3.9 para las bien nutridas y de 16.8 ± 4.6 en las desnutridas finalmente, para la subpoblación CD8⁺ CD4⁻ (simples positivas, sólo CD8⁺) los promedios obtenidos fueron de 9.1 ± 4.1 en el timo de las ratas testigo y 10.9 ± 3.9 en las ratas con desnutrición. La comparación estadística indica diferencia significativa entre los dos grupos de organismos en los porcentajes de timocitos dobles positivos y dobles negativos. Se evidenció que el porcentaje de células CD4⁺CD8⁺ es menor y el porcentaje de CD4⁻CD8⁻ es significativamente mayor en las ratas con desnutrición. En el caso de los timocitos simples positivos, sólo CD4⁺ y sólo CD8⁺, los valores obtenidos en ambos grupos de organismos son muy similares, sin diferencia estadísticamente significativa.

Además, los datos reflejan que la variabilidad es mayor en los porcentajes de las células dobles positivas, en las ratas con desnutrición en relación con la del grupo testigo, la des-

viación estándar es dos veces mayor (7.9 vs 3.4). También los porcentajes de células dobles negativas muestran una mayor dispersión en las desnutridas, en este caso la desviación estándar es casi tres veces mayor (4.6 vs 1.6).

DISCUSIÓN

La desnutrición en muchas de sus formas tiene un fuerte impacto en el tamaño de los tejidos linfoides, particularmente, sobre el timo más que otros órganos (Prentice, 1999; Chevalier, 1997). La determinación del tamaño de los órganos linfoides es la más cruda estimación de daño sobre la función. En este estudio se detectó una marcada atrofia del timo en las ratas desnutridas, el tamaño y el peso del timo se encontraron considerablemente disminuidos, lo cual se ilustra en la Figura 2, esta observación concuerda con datos previamente reportados (Jambon *et al.*, 1998; Fraker *et al.*, 1995).

En relación con la observación de que el timo es siempre el órgano más vulnerable al estrés nutricional, Malpuech-Brugere y colaboradores (1999), consideran que la atrofia representa un proceso controlado por la inducción de la muerte celular programada o apoptosis. Asimismo, Prentice (1999) propone que el mecanismo ha evolucionado para priorizar el mantenimiento del órgano bajo la desnutrición.

Se ha determinado que en el timo de la rata se dan cambios en las subpoblaciones relacionados con la progresiva remodelación del órgano, estos cambios están relacionados con la edad (Capri *et al.*, 2000).

En relación con lo anterior, consideramos de interés el estudiar las probables modificaciones en los subtipos celulares del timo de rata en diferentes edades. Aunque, si bien, el análisis del efecto de la desnutrición en diferentes etapas de la vida es relevante, los estudios durante las etapas tempranas de la vida podrían considerarse prioritarios. En la rata la etapa de la lactancia corresponde a la infancia temprana en los

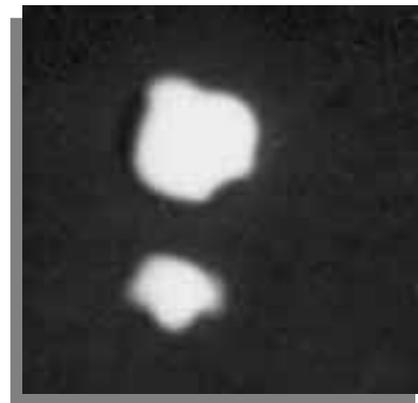
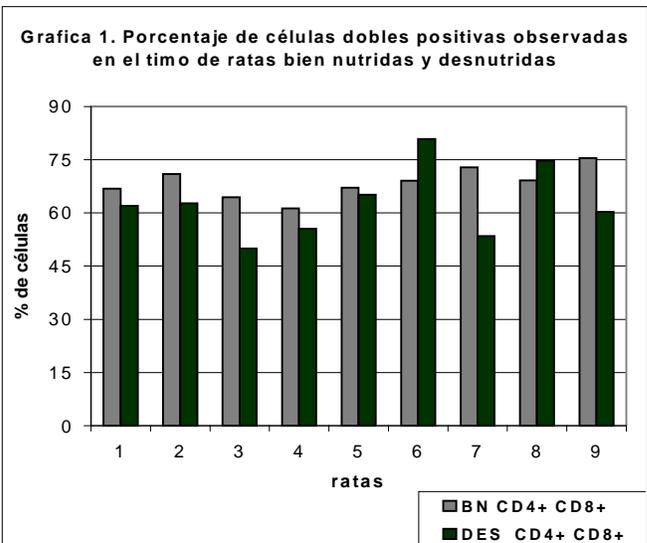


Figura 2. Comparación del tamaño del timo extraído de una rata bien nutrida (A) y de una rata desnutrida severamente durante el periodo de lactancia (B). Como se puede observar, la desnutrición por competencia de alimento produce atrofia en el timo de rata.



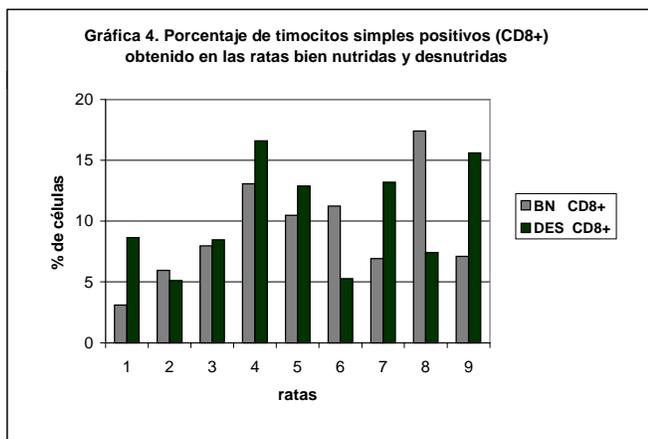
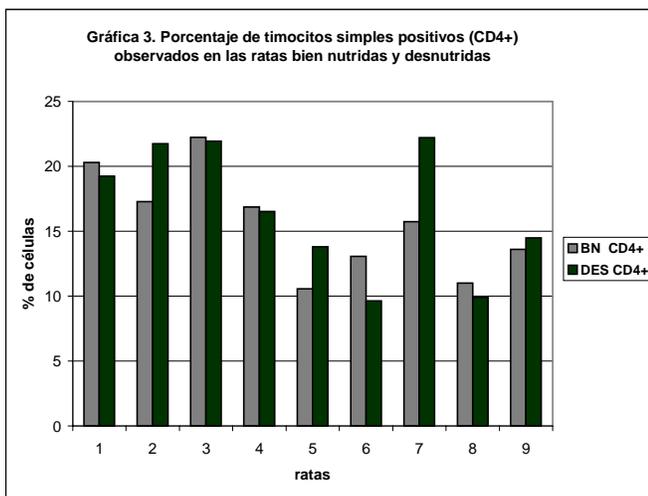
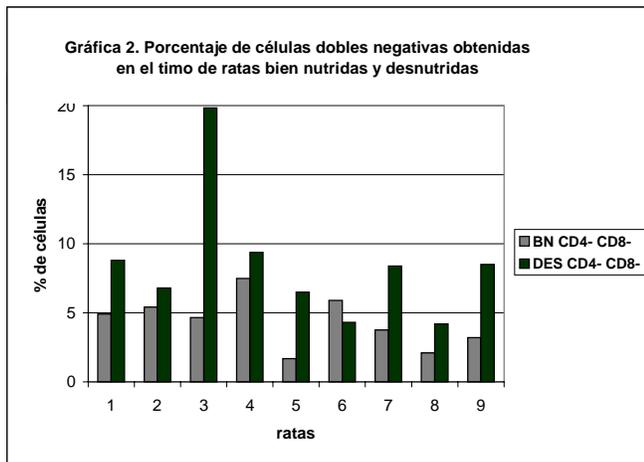
niños, donde la desnutrición se presenta con mayor frecuencia y causa detención (o retraso) en el crecimiento, mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas e incluso muerte temprana. También, es significativo señalar que en las ratas desnutridas en el periodo de lactancia por competencia de alimento, se presentan varios síntomas semejantes a las características clínicas observadas en los niños con desnutrición.

Se han detectado cambios en las subpoblaciones presentes en el timo en diversas condiciones y padecimientos (Roux *et al.*, 1989; Vicente *et al.*, 1998; Mastro *et al.*, 1999; Safadi *et al.*, 2000; Capri *et al.*, 2000). Se ha informado que la privación de nutrientes está relacionada con alteraciones en las subpoblaciones de timocitos, particularmente de las células dobles positivas CD4⁺ CD8⁺, que son la población celular principal relacionada con la selección de los timocitos (Howard *et al.*, 1999).

Es pertinente señalar que para el estudio de los diversos tipos celulares del timo, el análisis simultáneo de dos fluo-

CUADRO 1. Peso corporal observado a los 21 días de edad en las ratas Wistar con nutrición adecuada y de las ratas con desnutrición experimental durante la lactancia.

Rata	PESO CORPORAL (G)	
	Bien nutridas	Desnutridas
1	53.6	20.0
2	62.6	19.8
3	64.4	1128.2
4	47.2	27.0
5	65.0	28.8
6	48.2	25.0
7	54.0	20.2
8	44.8	26.0
9	54.4	29.4
Promedio	54.9	24.9*
D.E	7.6	3.9
* t = 10.521; 16 gl; p < 0.001		



rescencias es de gran utilidad, ya que permite reconocer los cuatro subtipos de células T que se están diferenciando (Esto es, los timocitos CD4+ CD8-, CD4-CD8+, CD4+ CD8+, y CD4-CD8-).

En este estudio observamos que en el timo de las ratas de 21 días con nutrición adecuada, la proporción de timocitos dobles positivos (CD4+ y CD8+) es la que se encuentra con

mayor frecuencia (69%), este dato coincide con lo previamente informado en la literatura (Yang y Bell, 1993). También se puede apreciar que los dobles negativos (CD4- CD8-) son los que se encuentran con una menor frecuencia (4%). Las células simples positivas (sólo CD4+ y sólo CD8+) representan el 25% del total; dentro de ellas las células CD4+ se observan con mayor frecuencia que las células CD8+, con valores de 15.4 y 9.1%, respectivamente. La relación entre ellas es de 1.7 (porcentaje de CD4+/porcentaje de CD8+).

En el timo de las ratas con desnutrición se encontraron alteraciones en la proporción de células dobles positivas y dobles negativas. Sin embargo, las subpoblaciones simples positivas (sólo CD4+) y (sólo CD8+) mostraron valores similares en ambos grupos de animales, que indica que la desnutrición no afecta la presencia de estos tipos celulares o bien, que dadas las alteraciones en los precursores de ellas, los probables cambios podrían ser inadvertidos.

En relación con las células dobles negativas se observó un incremento en el timo de las ratas desnutridas. Esto se puede considerar como un comportamiento general, ya que ocho de las nueve ratas desnutridas estudiadas presentan porcentajes superiores de CD4- CD8-, en comparación con el promedio obtenido en las ratas con nutrición adecuada. Sin embargo, la mayor variabilidad que se percibe en los datos de las ratas con desnutrición, esto es, la amplia dispersión de los resultados, que se refleja en una desviación estándar casi tres veces mayor a la del grupo testigo, podría estar relacionada con una respuesta heterogénea ante esta condición.

El incremento en los timocitos dobles negativos podría estar reflejando una acumulación de ellos por una alteración en el mecanismo de diferenciación, ya que este tipo celular es el precursor de los timocitos dobles positivos y de las células T maduras. Aunque este aumento podría también estar relacionado con modificaciones en el proceso de eliminación celular por apoptosis.

En cuanto al análisis de las células dobles positivas, se detectó una disminución en los porcentajes de este tipo celular en el timo de las ratas desnutridas. Se observó que siete de las nueve ratas estudiadas (78%) muestran porcentajes inferiores de CD4+ y CD8+ con respecto al promedio de las ratas testigo. No obstante, en este caso también se observó una mayor dispersión de los resultados en las ratas con desnutrición, la desviación estándar es dos veces mayor a la del grupo con nutrición adecuada, lo cual puede reflejar una respuesta heterogénea a la desnutrición.

La reducción en los timocitos dobles positivos podría implicar anomalías en la diferenciación, ya que ellos son la etapa intermedia en este proceso, además el deterioro de este subtipo celular puede reflejar un incremento en la muerte por apoptosis. Se ha descrito que en condiciones normales el proceso de apoptosis es muy importante en estas células del timo para la selección clonal, (Surh y Sprent, 1994; Hiramane et al., 1996). Pero también se ha evidenciado que ellas son muy sensibles a este proceso en diferentes condiciones (Provinciali et al., 1998).

Las alteraciones en la maduración y/o diferenciación de los timocitos que reflejan tanto el incremento en las células dobles negativas como la disminución de las células dobles positivas, observado en las ratas con desnutrición, parece estar asociado con modificaciones en el especializado microambiente del timo. Esto es, deficiencia de varios nutrientes esenciales requeridos para la diferenciación celular y para la regulación de la muerte celular programada o apoptosis (Malpuech-Brugere, *et al.*, 1999; Miyazaki, *et al.*, 1999).

Con base en nuestros resultados y en la información que se encuentra en la literatura, consideramos que es importante estudiar la apoptosis espontánea e inducida por diferentes agentes, en las diversas subpoblaciones del timo de las ratas con desnutrición, para profundizar en el conocimiento de las alteraciones relacionadas con esta condición.

En resumen, los resultados muestran que en el timo de las ratas de 21 días de edad, desnutridas experimentalmente durante la lactancia se observa un incremento en las células dobles negativas y una disminución de las células dobles positivas. Estas alteraciones indican defectos en el mecanismo de diferenciación y/o modificaciones en el proceso de eliminación celular selectivo por apoptosis. Asimismo, estas alteraciones pueden estar relacionadas con la deficiente respuesta inmune observada en los organismos desnutridos.

CUADRO 2. Porcentajes promedio de las subpoblaciones de timocitos obtenidos en los dos grupos de ratas Wistar de 21 días de edad.

Ratas	Porcentaje por tipo celular			
	T4+	T8+	T4-/T8-	T4+/T8+
Bien Nutridas	15.4 ± 3.9	9.1 ± 4.1	4.2 ± 1.6	69.2 ± 16.6
Desnutridas	16.8 ± 4.6	10.9 ± 3.9	8.5 ± 4.6 ^a	61.6 ± 7.9 ^a

^a t = 2.35; gl 16 p < 0.018

BIBLIOGRAFÍA

Alu V. & Murthy P. "Chromosomal abnormalities in starved and marginally malnourished rats in utero upon rehabilitation". *Experientia* 49, 1993. Pp. 258-262.

Bar-Dayán & Small M. "Effect of bovine growth hormone administration on the pattern of thymic involution in mice". *Thymus* 23, 1994. Pp. 95-101.

Bar-Dayán Y., Afek A., Bar-Dayán Y., Goldberg I. & Kopolovic J. "Proliferation, apoptosis and thymic involution". *Tissue & Cell* 31, 1999. Pp. 391-396.

Benedetti R., Goldman H., Fló J., Massouh E. & Roux M. E. "Alterations of B cell precursors in bone marrow of malnourished rats". *Com. Biol.* 10, 1992. Pp. 275-281.

Betancourt M., Ortiz R. & González C. "Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation". *Mutat. Res.* 283, 1992. Pp. 173-177.

Capri M., Quaglino D., Verzella G. et al. "A cytofluorometric study of T lymphocyte subsets in rat lymphoid tissues (thymus, lymph nodes) and peripheral blood: a continuous remodelling during the first year of life". *Exp. Gerontol.* 35, 2000. Pp. 613-625.

Chandra R. *Inmunología de los trastornos nutricionales*. México: El Manual Moderno, 1980. 120 pp.

Chevalier P. "Thymic ultrasonography in children, a non-invasive assessment of nutritional immune deficiency". *Nutr. Res.* 17, 1997. Pp. 1271-1276.

Cintra L., Galván A., Díaz-Cintra S. & Escobar C. "Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages". *Bol. Estud. Med. Biol. Mex.* 42, 1994. Pp. 11-19.

Cravioto J. & Vega-Franco L. "Historical highlights of Mexican contributions to human nutrition". *Arch. Med. Res.* 26 (Suppl.), 1995. Pp. S133-S137.

De-Mello M. A. R. "Effects of intrauterine and postnatal protein-calorie malnutrition on metabolic adaptations to exercise in young rats". *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27, 1994. Pp. 2461-2466.

Feledi C., Goldman A., Hebe L., Massouh E. y Roux M. E. "B and T cells in the intestinal mucosa of malnourished rats after the oral administration of cholera toxin". *Com. Biol.* 11, 1993. Pp. 275-282.

Fló J., Benedetti R., Feledi C. et al. "Studies of gut-associated lymphoid tissues and of systemic immune response to cholera toxin in a model of malnutrition". *Com. Biol.* 9, 1991. Pp. 321-327.

Fraker P., Osati-Ashtiani F., Wagner M. & King L. "Possible roles for glucocorticoids and apoptosis in the suppression of lymphopoiesis during zinc deficiency: a review". *J. Am. Coll. Nutr.* 14, 1995. Pp. 11-17.

Galler J. R. & Kanis K. B. "Animal models of malnutrition applied to brain research". *Curr. Top. Nutr. Dis.* 16, 1987. Pp. 57-73.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 1985. US Department of Health y Human Services. Public Health Service. National Institute of Health. NIH Publication No. 85-23. Animal resources program. Division of research Resources. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland 20 205, USA.

Hannet I., Erkeller-Yuksel F., Lydyard P., Deneys V. & DeBruyere M. "Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations". *Immunology Today* 13, 1992. Pp. 215-8.

- Hiramine C., Nakagawa T., Miyauchi A. & Hojo K. "Thymic nurse cells as the site of thymocyte apoptosis and apoptotic cell clearance in the thymus of cyclophosphamide treated mice". *Lab. Invest.* 75, 1996. Pp. 185-201.
- Howard J., Lord G., Matarese G. et al. "Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice". *J. Clin. Invest.* 104, 1999. Pp. 1051-1059.
- Jambon B., Ziegler O., Marie B. et al. "Thymulin (facteur thymique serique) and zinc contents of the thymus glands of malnourished children". *Am. J. Clin. Nutr.* 48, 1988. Pp. 335-342.
- Levinson W. E. & Jawetz E. *Medical microbiology & Immunology*. EUA: Appleton & Lange, 1993.
- Malpuech-Brugere C., Nowacki W., Gueux E. et al. "Accelerated thymus involution in magnesium rats is related to enhances apoptosis and sensitivity stress". *Brit. J. Nutr.* 81, 1999. Pp. 405-411.
- Mastro A. M., Schlosser D. A., Grove D. S. et al. "Lymphocyte subpopulations in lymphoid organs of rats after acute resistance exercise". *Med. Sci. Sports. Exerc.* 31, 1999. Pp. 74-81.
- Miyazaki T., Hirokami Y., Matsushashi N. et al. "Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily". *Journal of Experimental Medicine*, 189, 1999. Pp. 413-22.
- Morris D. L., Komocsar W. J., Searle G. D. "Immunophenotyping analysis of peripheral blood, splenic, and thymic lymphocytes in male and female rats". *J Pharmacol Toxicol Methods*. 37, 1997. Pp. 37-46.
- Ortiz R. & Betancourt M. "Length of cell cycle in vitro and sister-chromatid exchange frequency in bone marrow cells from severely malnourished rats". *Mutat. Res.* 232, 1990. Pp. 71-75.
- Ortiz R., Cortés E., González C., et al. "Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation". *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 1995. Pp. 55-59.
- . "Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation". *Med. Sci. Res.* 24, 1996. Pp. 843-846.
- . "Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica". *Anim. Exp.* 3, 1999. Pp. 33-39.
- Parnes J. "T-cell differentiation antigens: Proteins, genes and function". *BioEssays* 4, 1987. Pp. 255-9.
- Prentice A. M. "The thymus: a barometer of malnutrition". *Brit. J. Nutr.* 81, 1999. Pp. 345-347.
- Provinciali M., Di Stefano G. & Stronati, S. "Flow cytometric analysis of CD3/TCR complex, zinc, and glucocorticoid-mediated regulation of apoptosis and cell cycle distribution in thymocytes from old mice". *Cytometry*. 32, 1998. Pp. 1-8.
- Roux M. E., Lopez M. C., Melton E., Slobodianik N. H., Gonzalez-Ariki S. & Garcia P. "The lymphoid system and protein deficiency. Differentiation in the thymus and Peyer's patches". *Medicina (B Aires)* 49, 1989. Pp. 162-5.
- Safadi F. F., Dissanayake I. R., Goodman G. et al. "Influence of estrogen deficiency and replacement on T-cell populations in rat lymphoid tissues and organs". *Endocrine* 12, 2000. Pp. 81-8.
- Señor, K. "Defending the use of animals to research human disease". *Mol. Med. Today* 5, 1995. Pp. 220-225.
- Skulman S., Wiren M., Garlick P. J. et al. "Protein synthesis in regenerating rat liver during malnutrition". *J. Hepatol.* 21, 1994. Pp. 174-181.
- Surh C. D. & Sprent J. "T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus". *Nature* 372, 1994. Pp. 100-103.
- Veena P. & Murthy P. B. "Sister chromatid exchange frequency is elevated and cell proliferation is delayed in bone marrow cells of starved and marginally malnourished rats". *Mutat. Res.* 341, 1994. Pp. 101-108.
- Vicente A., Varas A., Acedon R. S. et al. "Appearance and maturation of T-cell subsets during rat thymus ontogeny". *Dev. Immunol.* 5, 1998. Pp. 319-31.
- Winick M. & Noble A. "Cellular response in rats during malnutrition at various ages". *J. Nutr.* 89, 1966. Pp. 300-306.
- Yang, C. P. & Bell, E. B. "Thymic education curtailed: defective immune responses in nude rats reconstituted with immature thymocyte subsets". *Int. Immunol.* 6, 1993. Pp. 569-577.
- Yoshino S., Narayanan C. H., Joseph F., Saito T. & Nakamoto T. "Combined effects of caffeine and malnutrition during pregnancy on suckling behavior in newborn rats". *Physiology & Behavior* 56, 1994. Pp. 31-37.

AGRADECIMIENTOS: Trabajo apoyado por FOMES clave: 98-35-28. Agradecemos el apoyo de la M.V.Z. Rocío González V., responsable del bioterio de la UAM-I y de la estudiante Guadalupe Sandoval G.

Guidelines for authors

The Editorial Board of the journal *Ciencia en la Frontera: Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ*, invites authors to submit manuscripts under three categories: research articles, short manuscripts (which will be short articles showing results of undergraduate thesis and written by the undergraduate students, reviewed by their advisers), and invited reviews. Manuscripts should be sent to the Editor in Chief, according to the following specifications:

- 1) Papers should be from original research and with scientific content.
- 2) Once published, articles cannot be published elsewhere in the same form, in any language, without the consent of UACJ publishers.
- 3) Papers may be: research articles, short manuscripts and invited reviews, belonging to the fields of natural or exact sciences (biology, life sciences, chemistry, mathematics, physics, etc). Final decisions concerning acceptability of the manuscripts will be made by the Editorial Board.
- 4) Papers may be written in English, Spanish or any Romance language. If a translation to Spanish is submitted, the text in original language should also be provided.
Abstracts written both in Spanish and English should also be provided.
- 5) Originals are not sent back.
- 6) If the author fails to respond to the final comments of the Editorial Board of *Ciencia en la Frontera: Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ*, the journal can make editing changes which do not modify the original content of the article.
- 7) Papers should meet the following format:
 - a) Short and concise title, written in both English and Spanish or Romance languages.
 - b) A brief abstract between 40 and 150 words, which should also be written in both languages.
 - c) Name and nationality of authors.

- d) Affiliation of authors, including highest degree and research field of all authors.
- e) Author affiliations should be included as footnotes starting from number 1.

Ex. Ramírez, J. L.¹ y Martínez, R.²

¹ Universidad de Puebla, México.

² Universidad de Santiago Compostela, España.

Footnotes should be posted at the bottom left side of the page where they are mentioned.

- f) Specify type of paper, i.e. Research article, Short manuscript or Invited Review.
- g) Postal address of the corresponding author, which includes: telephone, fax and e-mail. Corresponding author should be highlighted with an asterisk (*) mark.
- h) Manuscripts should be submitted in triplicate, printed in one side only, letter or A4 size paper, double-spaced, with margins of 3 cm.
- i) A disk copy of the manuscript in Win/Word 6.0 or higher, should also be provided. Figures and tables should be sent in Excel or WinWord 97, each saved in a different file.
- j) For Research articles, manuscript length should be between 10 and 30 pages, plus figures and tables. Short manuscripts should be shorter than 10 pages, plus figures and tables.
- k) Figures and tables should be mentioned in the text, and numbered in Arabic numbers. The software in which they were created, should be mentioned.
- l) Figure and table legends should be concise and understandable, and should be listed at the end of the manuscript (after references).
- m) Bibliographic references should be quoted in the text by writing the last name of the first author and publication year between parentheses. References will be included at the end of the text, ordered alphabetically.

- n) In references for book titles, capital letters should be used only at the beginning of the title and on authors names.
- o) When using abbreviations, the full meaning of them should be provided, when mentioned for the first time.
- p) Bibliographic references should be formatted as follows:

BOOK REFERENCES:

Author's last name, name (year). *Book title*. City: Editorial. Total pages.

Ex:

Foucault, Michael (1984). *Las palabras y las cosas*. México: Siglo XXI. Pp. 200.

BOOK SECTION REFERENCES:

Author's last name, first name (year). *Section title*. En: Editor's name and last name (ed.). *Book title*. City: Editorial. pages.

Ex:

Levine, Frances (1991). *Economic perspectives on the Comanchero trade*. En: Catherine A Spielmann (ed.). *Farmers, hunters and colonists*. Tucson, AZ: The University of Arizona Press. 155-169.

JOURNAL REFERENCES:

Auhor's last name, fist name(s) initial(s).; other authors. (year). "Article's title". *Journal abbreviation*, volume, pages.

Ex:

Sagara, Y., Fernandez-Belda, F., de Meis, L. E. Inesi, G. (1992). "Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin". *J. Biol. Chem.*, 267, 12606-12613.

Rivas-Cáceres, R. (1999). "Médanos de Samalayuca. Un urgente reclamo, una estrategia emergente". *Ciencia en la Frontera*, 1, 29-32.

Normas de publicación para colaboradores

El comité editorial de la revista *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ* acoge con gusto propuestas de artículos para su publicación, bajo dos modalidades: artículos de investigación y avances de investigación (artículos derivados de tesis de pregrado, escritos por los estudiantes y avalados por sus asesores). Las normas establecidas para la publicación son las siguientes:

- 1) Los trabajos deberán ser de *calidad científica e inéditos*, avalados por un investigador de carrera.
- 2) Una vez publicado el artículo, los derechos de autor pasan a la UACJ.
- 3) Los artículos pueden ser de fondo (de investigación), revisiones invitadas (actualizaciones en temas de investigación) o comunicaciones breves (avances de investigación), los cuales deberán referirse a las áreas de ciencias naturales y exactas, ajustándose al dictamen del Comité Editorial, quien evalúa su contenido científico de calidad y decide sobre la pertinencia de su publicación.
- 4) Los trabajos pueden ser enviados para su publicación en el idioma inglés, el español u otras lenguas romances. Si se envía una traducción al español, hay que adjuntar el texto también en forma original. Los artículos deberán incluir resumen en español seguido de uno en inglés (y viceversa).
- 5) No se devuelven los originales.
- 6) En caso de que el autor no responda después de haberse presentado las correcciones o dudas de su trabajo, la revista *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ*, se reserva el derecho de hacer los cambios de edición sin modificar el contenido original de la obra.
- 7) Los trabajos deben ajustarse a los siguientes requisitos (de no cumplirse con ellos, no se considerarán para su publicación):
 - a) Título del trabajo, breve y conciso en inglés y español.
 - b) Un resumen del contenido de una extensión aproximada de 40 palabras como mínimo y 150 palabras como

máximo que deberá estar en inglés y español.

- c) Nombre y nacionalidad del autor.
- d) Adscripción de todos los autores, incluyendo el máximo grado de estudios y área de especialización.
- e) La institución de adscripción de los autores participantes deberá incluirse como un pie de página, comenzando con el número 1.

Ejemplo: Ramírez, J. L.¹ y Martínez, R.²

¹ Universidad de Puebla, México.

² Universidad de Santiago Compostela, España.

Los pies de página, que denotan tanto la institución de adscripción como ciertos tipos de notas, etc; aparecerán en el margen inferior izquierdo de la página en la que se mencionen.

- f) Naturaleza del trabajo: artículo de investigación, avance de investigación, etc.
- g) Dirección para correspondencia que incluya: teléfono, fax y correo electrónico. El nombre del autor al cual se dirigirá la correspondencia debe indicarse con un asterisco (*).
- h) Presentar tres originales impresos en una sola cara, en papel Bond tamaño carta o A4, a doble espacio y con márgenes de 3 cm.
- i) Adjuntar el texto con una copia del trabajo en disquet, en formato Win/Word 6.0 en adelante, los cuadros y figuras en hoja de Excel o Win/Word '97 en adelante. Cada figura deberá estar grabada en un archivo individual.
- j) La extensión del trabajo deberá ser de un mínimo de 10 cuartillas de texto más las figuras, y de un máximo de 30 cuartillas más las figuras para un artículo de investigación. La extensión de los avances de investigación deberá ser de un máximo de 10 cuartillas de texto más las figuras.
- k) Las ilustraciones, cuadros y fotografías, deberán referirse dentro del texto, enumerándose en el orden que se cita en el mismo, e indicar el programa de cómputo en el que están elaborados.

- l) Los pies de figura deberán ser claros, de forma que se entiendan sin necesidad de leer el texto. Estas deberán incluirse en un listado después de la bibliografía.
- m) Las referencias bibliográficas deben asentarse de la forma convencionalmente establecida en español, es decir, indicando éstas en el cuerpo del texto con los apellidos del primer autor y año de publicación entre paréntesis, y los datos bibliográficos al final del escrito. La bibliografía se presenta al final del artículo por orden alfabético.
- n) Al citar los títulos de libro se deben utilizar mayúsculas sólo al inicio y en nombres propios.
- o) Al menos la primera vez, se deben proporcionar la equivalencia de las siglas empleadas en el texto, en la bibliografía y en los cuadros y las figuras.
- p) Distribuir los datos de las referencias bibliográficas de la siguiente manera:

REFERENCIA DEL LIBRO:

Apellidos, nombre del autor (año). *Título del libro*. Lugar: Editorial. Número de páginas totales.

Ejemplo:

Foucault, Michael (1984). *Las palabras y las cosas*. México: Siglo XXI. Pp. 30-45.

REFERENCIA DE CAPÍTULO DEL LIBRO:

Apellidos, nombre del autor (año). *Título del capítulo*. En: Nombre y apellido del editor (ed.). *Título del libro*. Lugar: Editorial. Páginas.

Ejemplo:

Levine, Frances (1991). “*Economic perspectives on the Comanchero trade*”. En: Catherine A Spielmann (ed.). *Farmers, hunters and colonists*. Tucson, AZ: The University of Arizona Press. 155-169.

REFERENCIA DE REVISTA:

Apellido(s) del autor, inicial(es); otros autores. (año). “Título del artículo”. *Nombre de la revista*, abreviado según el citation index o como aparezca en el artículo original, volumen, páginas.

Ejemplos:

Sagara, Y., Fernández-Belda, F., de Meis, L. e Inesi, G. (1992). “Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin”. *J. Biol. Chem.*, 267, 12606-12613.

Rivas-Cáceres, R. (1999). Médanos de Samalayuca. Un urgente reclamo, una estrategia emergente. *Ciencia en la Frontera*, 1, 29-32.

Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ,
se terminó de imprimir en mayo de 2002 en la Imprenta Universitaria
de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Av. Plutarco Elías Calles
y Av. Hermanos Escobar, C.P. 32310, Ciudad Juárez, Chih., México

Tiraje: 500 ejemplares