

Ciencia en la frontera

Revista de ciencia y tecnología de la UACJ

Luis Fernando Plenge Tellechea
Jorge Alberto Pérez León
(Coordinadores)

UACJ



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

DIRECTORIO

Jorge M. Quintana Silveyra
Rector

David Ramírez Perea
Secretario General

Martha P. Barraza de Anda
Coordinadora General de
Investigación y Posgrado

Hugo Staines Orozco
Director del ICB

Servando Pineda Jaimes
Dirección General de Difusión
Cultural y Divulgación Científica

CONSEJO EDITORIAL

Emilio Álvarez Parrilla
Leonel Barraza Pacheco
Alejandro Donohue Cornejo
Esaúl Jaramillo
Alejandro Martínez
Francisco Molinar Holguín
Antonio de la Mora
Helvia Pelayo Benavides
Luis Fernando Plenge
Joaquín Rodrigo García
Laura de la Rosa
Hugo Staines Orozco
Gilberto Reyes Leal
Yolanda Loya

DIRECTOR

Luis Fernando Plenge

FORMATO

César Arturo Muñiz

CONSEJO EDITORIAL INTERNACIONAL

Álvaro Álvarez Parrilla

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

Francisco Fernández Belda

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

Alex Frago 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

Tecnología de Alimentos de
Origen Vegetal, CIAD
Hermosillo, Sonora, México.

Louis Irwin

Biological Science, 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 Alimen-
tos, Universidad de Murcia, Murcia, España.

Gaspar Ros Berruezo

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.

Ricardo Tapia Ibarguengoytia

Neurociencias
IFC-UNAM

Herminia Pasantes

Neurociencias
IFC-UNAM

Thomas Kretzschmar Steinle

Área de Geofísica
CICESE en Ensenada
Baja California, México

Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ / Universidad Autónoma de Ciudad Juárez,
Coordinación General de Investigación y Posgrado. Vol. 5. (2007). Ciudad Juárez, Chih.: UACJ, 2007.

v. ; 21 cm.

Seriada

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

Q4.R48 1999

505.R48 1999

APOYADO CON RECURSOS PIFI

Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ Vol. 7, Número 1, 2009, es una publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, a través del Instituto de Ciencias Biomédicas y de la Coordinación de Investigación y Posgrado del ICB y el Departamento de Ciencias Básicas. Editor responsable: Fernando Plenge Tellechea. Reserva al uso exclusivo otorgada por INDAUTOR Núm. 4-2007-030513570700-01 y el ISSN 2007-042X. Publicidad, anuncios y suscripciones, dirigirse a: *Ciencia en la frontera:* revista de ciencia y tecnología de la UACJ, Heroico Colegio Militar 3775, 32310 Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Tel. (656) 688 18 85. Copyright © 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.

Presentación

En esta ocasión, nuestra revista presenta una edición especial. El lector encontrará trabajos tan disímiles como interesantes; leerá sobre el diseño de robots, el estudio de las medidas antropométricas de los futbolistas profesionales y la historia de nuestras joyas arquitectónicas, junto con la descripción de los sitios de mayor interés turístico de la entidad. Al mismo tiempo, se adentrará en trabajos de investigación original que escudriñan los mecanismos de reacción de las enzimas, la situación de las instituciones de Educación Superior en el país, la prospección en el consumo de agua y otros que aprovechan la conjunción de las ciencias químico-biológicas.

Tal variedad se debe al deseo de reflejar la floreciente actividad de Investigación de nuestra Universidad, pues en este volumen hemos dedicado un fascículo a cada uno de los institutos que constituyen la máxima casa de estudios de Ciudad Juárez.

Concebido como un colofón al Foro de Investigación Científica de nuestra Universidad, realizado en el 2009, aquí se reúne el producto académico de varios grupos que mantienen vigente el espíritu de las actividades sustantivas de nuestra Institución: gestión, docencia e investigación. De forma única, el presente volumen es un tributo a la búsqueda de la excelencia bajo la adversidad. En éste, los docentes de la UACJ presentan el fruto de su trabajo de investigación original, una actividad que cierra y reinicia la espiral interminable de la actividad académica. Quien enseña no puede transmitir cabalmente sus conocimientos, a no ser que pueda por sí mismo generarlos y es durante la labor docente que el profesor investigador imbuye de ese espíritu a los jóvenes alumnos.

La obra ecléctica que ahora editamos lleva el mensaje más importante de nuestra labor: la UACJ es una institución comprometida con la generación de conocimiento, sin descuidar su compromiso social de preparar a los profesionistas que mejorarán las condiciones sociales del norte del país.

Agradecemos la colaboración de cada uno de los académicos que han contribuido a este volumen, para ellos, nuestro más encarecido reconocimiento y felicitación.

CONTENIDO

Los citocromos P450 en los 5 reinos de Margulis

Rafael Valencia-Quintana, Juana Sánchez-Alarcón, Sandra Gómez-Arroyo,
José Luis Gómez-Olivares y Stefan Marian Waliszewski Kubiak..... 9

Control de un robot manipulador mediante señas gesticulares

Jesús Ornelas López, Édgar A. Martínez García 27

Factores a considerar en la digestibilidad In Vivo en rumiantes

Héctor González García, Roberto Martínez de la Rosa
y Hugo Enrique Hernández Contreras 43

Implementación de una nueva tecnología para minimizar la contaminación del aire derivada de hornos ladrilleros

Corral-Avitia A. Y, Bruce, C., Jiménez, R., Lara, A. S., Márquez, R.O. 49

Nfkb y su relación en la fibrosis hepática

Elizabeth Hernández Pérez, Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz 55

Potencial genotóxico de aguas superficiales y sedimentos del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan y de efluentes industriales en el estado de Tlaxcala

Valencia-Quintana R., Gómez-Olivares J.L., Sánchez Alarcón J.,
Castillo-Cadena J. y Waliszewski S. 61

Proporción sexual en tres poblaciones naturales de Drosophila Pseudoobscura originarias de la Península de Baja California

Víctor M. Salceda 73

Uso del icp-oes para la determinación de la composición elemental en partículas en el aire de menos de 10 µm en algunas áreas de la ciudad de Chihuahua, México

Marcos Delgado R., Luisa Manzanares P., Alberto Duarte M.,
Arturo Keer R., Jorge Gardea-Torresdey 79

CONTENTS

Cytochrome P-450 in the 5 Kingdoms Margulis

Rafael Valencia-Quintana, Juana Sánchez-Alarcón, Sandra Gómez-Arroyo, José Luis Gómez-Olivares y Stefan Marian Waliszewski Kubiak9

Since the cytochromes P-450 were found out in the living organisms, the numbers and types which have been described have increased, especially in the last years. It is very likely they are the enzymatic systems most versatile in nature, and have been observed in a broad range of living organisms, from microorganisms to mammals, including plants and fungi. They constitute a “superfamily” of hemoproteins catalyzing the oxidation of a variety of compounds both endogenous and exogenous. An important characteristic of these enzymes is their capacity for performing a variety of functions in organisms so different as bacteria and human beings. Although research on the system P-450 of mammals predominates, the literature shows a growing interest on ascertain its relevance in other groups. In this paper the cytochromes P-450 identified in the different procariont and eucariont organisms are described comparatively.

Hand Gestures-Based Control of a Robotic Arm

Jesús Ornelas López, Édgar A. Martínez García27

The development of a human-machine interface (HMI) is presented in this work as an alternative to the traditional control interfaces systems (e.g. joystick, dataglove, etc) for controlling a robotic arm. The present system has the ability to visually recognize a set of pre-defined hand gestures. This HMI provides robustness and more degrees of freedom than a joystick, having many potential real applications such as in tele-surgery by deploying a surgeon’s assistant manipulator. This system interface is formed of a computer vision system and a classifier, the former extracts characteristics of a hand gesture, while the latter confidently classifies each gesture using the Nearest Mean Method. The overall system’s ability to control a manipulator arm is tested through simulation, showing robustness and effectiveness. The HMI design provides the ability to increase the number of hand gestures that are recognized in order to rise the flexibility of the system.

In Vivo Digestibility Technique In Ruminants

Héctor González García, Roberto Martínez de la Rosa y Hugo Enrique Hernández Contreras43

Digestibility is determined by measuring the amount of food consumed and the amount of feces eliminated after an animal has had enough time to get used to a diet. Conventional measures of digestibility have contributed significantly to the development of systems that describe the nutritional value of food. Most studies conducted digestibility for foods used in feeding ruminants were tested with sheep, because they are easier to handle and amounts of food and excreta involved in the tests are smaller with compared to cattle.

A New Technology Implementation to Minimize Air Pollution from Brick Kilns

Corral-Avitia A. Y, Bruce, C. , Jiménez, R. , Lara, A. S. , Márquez, R.O.49

Brickmakers, in general, use low quality fuels such as sawdust, scrap wood, used motor oil, waste plastics, and scrap tires to fire their bricks. Pollutants produced during the firing process include particulate, organic compounds, carbon monoxide and nitrogen oxides. A new technology was designed to address air pollution from brick kilns. The MK system involves covering the kilns with a dome and channeling the output of an active kiln through a second, identical loaded kiln for its additional filtration of the effluents. Kilns of a pair are connected via clay brick channels. The roles are reversed after the initial kiln is refilled. The objectives presented in this work summarize the efforts placed on the deployment and development of the MK Kiln system. This paper presents first the brickmaker's training performed on the use of this technology; second, MK kilns use assessment and technology permanence in Ciudad Juarez, and finally the MK efficiency with the use of alternative fuel. The emissions are reduced with the use of the MK kilns with simultaneous benefits to the brickmakers. However, this project still in experimental process and future results will encourage the deployment of the kilns in Mexico, although the optimal use of the kilns depends on the attitude of the brickmakers to assimilate this new technology.

Hepatic fibrosis and nfkb

Elizabeth Hernández Pérez; Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz57

NFκB is a dimeric transcription factor. NFκB is formed by the dimerisation of Rel factors. There are 5 members of the Rel family-Rel A (p65), NFκB1 (p50), NFκB2 (p52), c-Rel and RelB. These different combinations of Rel factors form various homo and heterodimers that bind to a common DNA binding motif (κB site). It has been implicated in a diverse range of diseases including liver fibrosis. Liver fibrosis is characterized by an excessive production of extracellular matrix proteins, mainly α (I) collagen. Since NFκB it has been involved in several diseases, it has been studied the effect of blocking NFκB activation. In this way it has been reported beneficial results in liver fibrosis.

Genotoxic potential of surface water and sediment-water of the hydrologic system***Atoyac/ Zahuapan and industrial effluents in the Tlaxcala state***

Valencia-Quintana R., Gómez-Olivares J.L.,

Sánchez Alarcón J. Castillo-Cadena J. y Waliszewski S.63

Industrial effluents, agricultural fields, and municipal sewage bear unknown chemicals and complex mixtures that mean a potential risk to the exposed organism's health. In this paper, using meristematic cells from Vicia faba roots and human lymphocytes in culture as test systems, cytogenetic damage markers -as exchange of sister chromatids and chromosomal aberrations- and cell proliferation markers, induced by water and sediments from the Hydrologic System Atoyac-Zahuapan, as well as industrial effluents, are evaluated. Genotoxicity is related with the industrial and domestic waste products which are dumped into the river.

Sex Ratio in Three Natural Populations of *Drosophila Pseudoobscura* From the Baja California Peninsula

Víctor M. Salceda.....75

Sex-ratio (proportion of males) in a species is related to a not entirely explained mechanism of sex determination. In *Drosophila*, sex is determined by the proportion of X-chromosomes vs. autosomes. A decrease in the proportion of males vs. females, known as sex-ratio, is characteristic to several *Drosophila* species. It is often related to the inversions on sex-chromosomes. The present work analyses the number of progeny of females and males from three natural *D. pseudoobscura* populations collected at the Baja California Peninsula. We calculated the sex ratio according to Darwin (1971) equivalent to a how many males per 100 females. The sex ratio in each population was done in three conditions: global form, dividing the populations in homozygous and heterozygous and karyotypic classes. Our results were globally for San Pedro Mártir 74.5, for Las Animas 95.4 and for San Ignacio 103.6 males for every 100 females. These results suggest that in nature there are more females than males; also we found a North-South line for this characteristic.

Use of icp-oes to determine the elemental composition in air particulate matter less than 10 µm in some areas of Chihuahua city, Mexico

Delgado R., Marcos; Manzanares P., Luisa; Duarte M., Alberto; Keer R., Arturo; Gardea-Torresdey, Jorge.....81

The purpose of this study is to correlate trace metal concentrations in airborne particulate matter and mass fraction distribution within the city of Chihuahua, Mexico. The samples were obtained through glass fiber filters and the diameter differentiation of particles was obtained using a high volume, cascade impactor sampling instrument. The chemical analysis was done with an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES). Mass fractions of particulate matter, distribution patterns, and the correlation between metal pairs were obtained for eighteen heavy metals in 29 samples. The finest particles (<0.49 µm) represent approximately 50% of the total mass of particulate matter and also have the highest concentration of heavy metals. A correlation between particulate matter size and heavy metal concentration was found for the finest cut point of the cascade impactor (<0.49 µm).

Los citocromos P450 en los 5 reinos de Margulis

Rafael Valencia-Quintana¹, Juana Sánchez-Alarcón¹, Sandra Gómez-Arroyo²,
José Luis Gómez-Olivares³, y Stefan Marian Waliszewski Kubiak⁴

RESUMEN

Desde el descubrimiento de los citocromos P450 en los seres vivos, el número y los tipos descritos han aumentado, en particular en años recientes. Son quizá los sistemas enzimáticos más versátiles de la naturaleza y se han encontrado en un gran número de seres vivos, desde microorganismos hasta mamíferos, así como plantas y hongos. Constituyen una “superfamilia” de hemoproteínas que cataliza la oxidación de una amplia variedad de compuestos, tanto endógenos como exógenos. Una característica de estas enzimas es su capacidad para realizar diversas funciones en organismos tan distintos, como las bacterias y los seres humanos. Aunque las investigaciones sobre el sistema P450 de mamíferos son las predominantes, la bibliografía refleja un interés creciente en determinar la importancia de los P450 en otros grupos. En este trabajo se describen de manera comparativa los P450 presentes en los diferentes grupos de organismos procariontes y eucariontes.

Palabras clave: Salud, adulto mayor, nutrición.

INTRODUCCIÓN

Con más de 400 proteínas en la superfamilia génica P450, identificados y secuenciados (Graham-Lorence y Peterson 1996), los P450 son notables ya que son muchos y realizan diversas funciones. Éstos son el producto de una superfamilia que está representada en todos los *fila*, así como en diversas especies, desde bacterias hasta animales, lo que hace suponer la existencia de un ancestro común desde antes de la divergencia de procariontes y eucariontes (Nelson y Strobel, 1987).

La capacidad para activar el oxígeno molecular y subsecuentemente insertarlo en un sustrato, ha sido explotada por los organismos para muchos propósitos. Consecuentemente, existen docenas de diferentes moléculas de citocromo P450 aun en un sólo organismo. Cada P450 tiene una distinta especificidad por el sustrato, pero a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de las enzimas, la especificidad al sustrato de un solo citocromo P450 puede ser muy amplia (Nelson y Strobel, 1987).

Las enzimas P450 son importantes en los metabolismos oxidante, peroxidante y reductor de

¹ Facultad de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala. e-mail: prvq2004@yahoo.com.mx.

² Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM.

³ Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana.

⁴ Instituto de Medicina Forense, Universidad Veracruzana.

numerosos compuestos endógenos, tales como esteroides, bilis, ácidos grasos, prostaglandinas, leucotrienos y aminos biogénicas. Muchas de estas enzimas también metabolizan un rango amplio de agentes químicos extraños que incluyen drogas, contaminantes ambientales, productos vegetales naturales y alcoholes. El metabolismo de xenobióticos puede frecuentemente producir metabolitos tóxicos, de los cuales algunos han sido implicados como agentes que pueden ser responsables para la iniciación de tumores o la promoción y progresión de éstos.

En la actualidad, los mayores esfuerzos se concentran en definir el papel de muchos P450 nuevos, presentes en plantas, insectos, peces, etcétera (Estabrook, 1996), donde ellos juegan un papel crítico en el metabolismo secundario. El futuro promete la comprensión del papel que juegan los P450 en la determinación de, por ejemplo, el color de las flores (Holton *et al.*, 1993), la resistencia de insectos a plaguicidas (Hodgson *et al.*, 1993) y el efecto de la contaminación del agua sobre peces (Stegeman y Lech, 1991).

CITOCROMO P450 EN ORGANISMOS UNICELULARES

La ubicuidad de las monooxigenasas entre la mayoría de las formas vivientes que existen en la naturaleza, es un reflejo de su papel importante en el mantenimiento de las funciones biológicas. Como se ha mencionado, la capacidad de estas moléculas para metabolizar muchas sustancias es una propiedad que tanto procariontes como eucariontes han aprovechado ampliamente (Sanglard y Käppeli, 1993).

Los organismos unicelulares poseen estas enzimas oxígeno-dependientes en sus vías de degradación, aunque el número de investigaciones y reportes acerca de los P450 de microorganismos representa una pequeña fracción, comparada con los estudios en mamíferos.

Reino monera

Citocromos P450 de bacterias

Desde un punto de vista histórico, el descubrimiento de los P450 en bacterias fue reportado por Appleby (1967) en *Rhizopus* y por el laboratorio de Gunsalus en *Pseudomonas putida* (Katagari *et al.*, 1968). Desde entonces, diferentes citocromos P450 bacterianos han sido documentados.

I. Citocromo P450 alcanfor-hidroxilasa de *Pseudomonas putida*

Como se mencionó anteriormente, *P. putida* ha sido descrita como capaz de inducir una P450 alcanfor hidroxilasa (P450_{cam}), que es producida en grandes cantidades cuando crece en presencia de este compuesto. Además, este pigmento es una proteína soluble, siendo una de las primeras P450 purificadas y homogeneizadas (Yu *et al.*, 1974).

P450_{cam} es la única forma que ha sido cristalizada y de la cual su estructura ha sido revelada por rayos X a 1.63 Å (Poulos *et al.*, 1987), ya que ninguna estructura tridimensional de P450 eucariote ha sido obtenida, la estructura del P450_{cam} ha servido como un modelo para concebir la forma aproximada de los P450 eucariontes.

II. Citocromo P450 linalool 8-metil hidroxilasa de *Pseudomonas putida (incognita)*

Linalool 8-hidroxilasa (8-lin) fue detectada en primera instancia por Madhyasta *et al.* (1977). La monooxigenasa cataliza dos reacciones cíclicas, p.e. la formación de 8-oxo-linalool vía el 8-alcohol. Ullah *et al.*, (1990) fueron capaces de purificar los componentes de la linalool 8-metil hidroxilasa, que consisten del citocromo P450 (8.lin), LIN reductasa y LIN redoxina, las cuales difieren ligeramente en sus propiedades fisicoquímicas de sus contrapartes encontradas en el sistema alcanfor-hidroxilasa. La linalool 8-metil hidroxilasa ofrece un sistema P450 monooxigenasa microbiano adicional muy cercano al sistema alcanfor-hidroxilasa pero con otros sitios activos.

III. Citocromo P450 lípido hidroxilasa de *Bacillus megaterium*

Miura y Fulco (1974, 1975) demuestran en estudios sobre las hidroxilaciones de ácidos grasos en bacterias, que *B. megaterium* es capaz de catalizar la monooxigenación de ácidos grasos saturados de cadena larga, alcoholes y amidas. Se describe la presencia de tres formas distintas de P450, denominadas BM-1, BM-2 y BM-3 (Schwalb *et al.*, 1985). BM-3 a diferencia de las proteínas más pequeñas BM-1 y BM-2, contiene una molécula de FAD y otra de FMN por grupo hemo (Nahri y Fulco 1986). Éste es catalíticamente autosuficiente en la presencia de NADPH. Se especula que semeja a los componentes monooxigenasa microsómicos de eucariontes y se origina por la fusión de estos dos componentes en una sola proteína (Nahri y Fulco 1987). La clonación del *CYP102*, el gen de BM-3 y su estructura primaria deducida, confirman lo adecuado de este modelo. La secuencia N-terminal de BM-3 contiene el dominio del P450 mientras que el extremo C-terminal presenta similitud al NADPH-citocromo P450 reductasa de eucariontes (Ruettinger *et al.*, 1989).

Una propiedad remarcable de los P450 de *B. megaterium* es su inducibilidad por barbitúricos (fenobarbital, secobarbital, metohexital) de una forma dependiente de la dosis (Nahri y Fulco, 1982, Kim y Fulco, 1983). Estos resultados proveen evidencia de que los mecanismos de regulación por fenobarbital están relacionados en bacterias y mamíferos.

IV. Citocromos P450 de Actinomicetos

Los actinomicetos pertenecen a un grupo de organismos conocido no sólo como productores de una variedad de metabolitos de interés industrial (antibióticos), sino también como metabolizadores de xenobióticos. El metabolismo de estos compuestos frecuentemente incluye reacciones de monooxigenación e hidroxilación. No es así sorprendente que muchos de los actinomicetos contengan hemoproteínas como las P450.

1. Citocromos P450 inducibles por herbicidas de

Streptomyces griseolus.- *S. griseolus* es capaz de co-metabolizar algunos herbicidas sulfonilureicos a compuestos que exhiben fitotoxicidad reducida. Estas reacciones son llevadas a cabo por citocromos P450 monooxigenasas formados por un sistema de tres componentes, como se observa en la mayoría de las monooxigenasas bacterianas (O'Keefe *et al.*, 1987). Dos formas distintas de P450, SU1 y SU2, pueden ser purificados de extractos de células tratadas con herbicidas.

Los genes *SU1* y *SU2* han sido aislados, basados en la similitud entre las secuencias de aminoácidos derivadas (44.4 %) y en su baja relación con otros miembros de familias génicas de P450 conocidas, ambos fueron asignados a una nueva familia génica *CYP105* (Omer *et al.*, 1990).

2. Citocromo P450 inducido por flúor de soya en *Streptomyces griseus*.- Sariaslani y Kunz (1986) demuestran que el flúor de soya y uno de sus constituyentes, el isoflavonoide genisteina, indujeron P450 y sugieren que la hemoproteína podría ser responsable de las reacciones de biotransformación observadas en este organismo. El sistema P450 monooxigenasa es caracterizado por su amplia especificidad por el sustrato, la cual contrasta con la estrecha especificidad descrita en otros P450 procarióticos y así se semejan a sus equivalentes en mamíferos.
3. Citocromo P450 6-desoxieritronolida B hidroxilasa de *Saccaropolyspora erythracea*.- La eritromicina es un antibiótico importante producido por *S. erythracea*. Un citocromo P450 monooxigenasa está involucrado en las primeras etapas de la ruta biosintética de este compuesto, que convierte la 6-desoxieritronolida B a eritronolida B. Dos formas P450 (ery I y ery II) fueron purificadas y reconstituidas en un sistema que contiene ferredoxina y ferredoxina NADPH-oxidoreductas de espinacas y fueron capaces de llevar a cabo la reacción antes mencionada. Se ha clonado uno de estos P450 y se

le ha asignado una familia génica separada llamada *CYP107* (Nebert *et al.*, 1991).

4. Citocromo P450 hidroxilasa inducible por compactina de *Streptomyces carbophilus*.- La incubación de *S. carbophilus* con compactina, produce citocromo P450 y se asume que éste está involucrado en la hidroxilación de este compuesto a pravastatina. La purificación de las monooxigenasas produce dos tipos de P450, sca1 y sca2. Ambas formas hidroxilan compactina en un sistema reconstituido con ferredoxina y NADPH-ferredoxin oxidoreductasa (Matsuoka *et al.*, 1989).
5. Citocromo P450 inducible por veratrole en *Streptomyces setonii*.- Veratrole induce la biosíntesis de P450 en *S. setonii*, por la adición de este compuesto y de guaiacol a extractos celulares.

Reinos Protocista y Fungi

Citocromos P450 de microorganismos Eucariontes

Los microorganismos eucariontes comprenden organismos unicelulares que presentan núcleo, entre los cuales destacan las levaduras y los hongos filamentosos. Los citocromos P450 monooxigenasas han sido reportados en estos organismos casi desde el “nacimiento” del inmenso interés en estas hemoproteínas (Lindenmayer y Smith 1964). Es importante resaltar que los P450 de estos eucariontes comparten algunas de las características observadas para otros eucariontes (plantas, mamíferos, hombre). Comparados con los tres componentes de sistemas bacterianos, las monooxigenasas de microorganismos eucarióticos son reducidas a hemoproteínas enlazadas a membranas y a flavoproteínas NAD(P)H específicas, involucradas en la transferencia de electrones. En la transición de procariontes a eucariontes, uno de los constituyentes, una proteína hierro-azufre, es perdida o sustituida por otro transportador de electrones, como el citocromo *b₅*.

I. Citocromos P450 de levaduras

Un gran número de levaduras han sido investiga-

das por su capacidad para sintetizar formas de citocromo P450 monooxigenasas (Müller *et al.* 1984, Käppeli 1986). Sin embargo, unas cuantas formas han sido sujeto de análisis detallados. Así, sólo tres formas principales involucradas en diferentes actividades metabólicas han sido descritas, las cuales incluyen lanosterol desmetilasas, monooxigenasas de alcanos y de ácidos grasos y una tercera categoría involucrada en la formación de la pared de la espora.

1. Citocromo P450 14 α -lanosterol desmetilasa.- El gen para la 14 α -lanosterol desmetilasa (CYP51A1) fue clonado por Kalb *et al.* (1986, 1987). Genes CYP51A ortólogos han sido clonados de otras especies de levaduras las cuales incluyen *Candida albicans* y *C. tropicalis* (Chen *et al.*, 1988; Lai y Kirsh, 1989).

El otro componente del lanosterol 14 α -desmetilasa, la NADPH-citocromo P450 reductasa, ha sido purificada y su gen, CPR clonado (Yabusaki *et al.*, 1988; Sutter y Loper, 1989). El gen ortólogo CPR fue también aislado en *C. tropicalis* (Sutter *et al.*, 1990).

2. Citocromo P450 monooxigenasa inducible por alcanos.- El crecimiento de las levaduras en alcanos como fuente de carbono requiere un sistema P450 monooxigenasa inducible que convierte los alcanos químicamente inertes a productos oxidados que pueden seguir siendo metabolizados.

En 1987 se clona un gen P450 inducido por alcanos en *C. tropicalis* que fue denominado CYP52A1, ya que éste pertenece a una familia génica separada (Sanglard *et al.*, 1987). El producto del gen, alk1 exhibe ω -hidroxilación de ácidos grasos con el ácido laurico como sustrato (Sanglard y Loper, 1989). Poco después, un segundo gen P450, CYP52A2, fue aislado y caracterizado. Su producto génico, alk2, fue caracterizado. Interesantemente, alk2 presenta sólo actividad ω -hidroxilación de alcanos (hexadecano), mientras que alk1 usa tanto hexadecano como ácido laurico como substra-

tos (Seghezzi *et al.*, 1991). *Candida tropicalis* contiene una familia multigénica (CYP52A1, CYP52A2 y CYP52A6).

Otros P450 inducibles por alcanos son aislados de *C. maltosa*, a decir: CYP52A3, CYPA4 y CYP5 (Schunck *et al.*, 1989; Tagaki *et al.*, 1989; Ohkuma *et al.*, 1991). Estos genes han sido asignados a la misma subfamilia génica, ya que éstos presentan similitudes hasta de un 55% al compararse unos con otros.

3. Citocromos P450 involucrados en la maduración de la pared de la espora.- Dos genes llamados DIT1 y DIT2 han sido clonados. Al analizar DIT2, la secuencia de aminoácidos presenta homología significativa con un 24% de identidad con la 17 α -hidroxilasa de bovinos, mientras que esta identidad fue de 12% con los otros P450 de levaduras. Sobre estas bases DIT2 fue asignado a una nueva familia génica, CYP56.

II. Citocromos P450 de hongos

El versátil metabolismo de los hongos es ilustrado por su capacidad para oxidar xenobióticos al igual que por su facilidad para sintetizar metabolitos secundarios tales como antibióticos, toxinas o esteroides.

1. Citocromo P450 Benzoato-*p*-hidrolasa de *Aspergillus*.- Este gen fue asignado a una nueva familia génica llamada CYP53. La enzima sólo se presenta después de la inducción.
2. Citocromo P450 pisantin desmetilasa de *Nectria haematococca*.- Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se acumulan en plantas después de su exposición a microbios y constituyen un mecanismo de defensa activo en los vegetales. El patógeno *N. haematococca* puede eludir este mecanismo de defensa inactivándolo. La inactivación es llevada a cabo por la desmetilación del pisatin, una etapa llevada a cabo por la citocromo P450 monooxigenasa (pda) (Desjardins y VanEtten 1986). La pisatin desmetilasa puede ser re-

construida en presencia de NADPH-citocromo P450 reductasa y PDA. Se le ha asignado una nueva familia génica llamada CYP57 (Nebert *et al.*, 1991).

3. Citocromo P-450 monooxigenasas de *Fusarium oxysporium*.- Shoun *et al.*, (1983) aíslan de *F. oxysporium* un P450 conteniendo las fracciones A, B y C. Estas enzimas catalizan las hidroxilaciones ω -1, ω -2 y ω -3 del ácido laurico, dependientes del NADPH. La estructura primaria de dNIR, que fue deducida del gen clonado CYP55, no revela un aparente dominio transmembranal N-terminal típico visto en todos los P450 eucarióticos y esto apoya las primeras observaciones de la naturaleza soluble de este P450 particular.
4. 11 α -progesterona hidroxilasa de *Rhizopus nigricans*.- Este hongo puede hidroxilar progesterona así como otros esteroides en la posición 11 α -. Breskvar *et al.*, (1987) encuentran la 11 α -progesterona hidroxilasa en la fracción postmitocondrial en tres componentes: un citocromo P450, una rhizoporedoxina hierro-azufre y una rhizoporedoxin reductasa con FAD.
5. Citocromo P450 inducible por cicloheximida de *Neurospora crassa*.- La cicloheximida induce la producción de un polipéptido de 70-kDa. El gen ha sido recientemente aislado y forma parte de una nueva familia dentro de la superfamilia de los P450, esta es CYP70, se desconoce su papel (Attar *et al.*, 1989).
6. Citocromo P450 monooxigenasas de *Cunninghamella spp.*.- Las especies de *Cunninghamella* son capaces de degradar hidrocarburos policíclicos como el benzo(a)pireno en diferentes productos de oxidación. *Cunninghamella bainieri*, recientemente ha ganado importancia debido a su capacidad para mimetizar el metabolismo de monooxigenasas de mamíferos (Ferrís *et al.* 1976). Desde el descubrimiento de los citocromos P450 en los organismos, el número y tipo de citocromos P450 microbianos se ha incremen-

tado, especialmente en los años recientes. Con la mayoría de las formas de P450 descritas hasta ahora, es evidente que las P450 monooxigenasas son casi tan diversas como aquellas reportadas en mamíferos.

Con el presente conocimiento de los P450 de microorganismos procariontes y eucariontes, un cuadro más detallado puede ser descrito. La composición de las P450 monooxigenasas de bacterias generalmente siguen el arreglo de tres componentes con una sola excepción, BM-3, que es autocatalítica y estructuralmente más relacionada a los P450 monooxigenas microsómicas de eucariontes. La conformación de las P450 monooxigenasas BM-3 puede también ser encontrada en otras bacterias. Funcionalmente, las P450 monooxigenasas de bacterias son mejor conocidas por su participación en la degradación de fuentes de carbono. Este cuadro es ahora algo diferente, p.e. los P450 de actinomicetos se involucran en la síntesis de antibióticos y mecanismos de resistencia.

Reino Vegetal

Se ha reconocido ampliamente que las múltiples formas de P450 de animales, especialmente aquellas de la familia *CYP2*, son el resultado de la coevolución de plantas y animales fitófagos. El rápido avance en la caracterización de nuevos P450 en plantas (Durst 1991) evidencia que éstos están involucrados en las rutas biosintéticas de las principales fitoalexinas (compuestos sintetizados por las plantas para detener a los organismos hostiles. Así, parece que los productos de la misma superfamilia génica intervienen tanto en la síntesis de moléculas protectoras por las plantas como en su desintoxicación por animales. Se ha establecido la hipótesis de que las presiones para este proceso evolutivo ha conducido a los P450 en direcciones opuestas: La evolución de las formas metabolizadoras de las fitoalexinas con una especificidad amplia y sobrelapada en animales y la evolución de isoformas específicas que participan en la síntesis

de estos compuestos en plantas. Si esto es cierto, las plantas pueden proveer de un vasto repertorio de genes P450 (Durst y Benveniste, 1993).

Casi todas las enzimas P450 de plantas han sido asociadas con los microsomas y más precisamente con el retículo endoplásmico (RE). No hay pruebas de la existencia de P450 mitocondrial en plantas, aunque corrimientos proteicos para su análisis en Western blot de fracciones subcelulares de chícharo usando anticuerpos dirigidos contra la alcanfor hidroxilasa de *Pseudomonas putida* indican ligera reacción cruzada con proteínas mitocondriales (Stewart y Schuler 1989).

En experimentos de reconstitución se ha encontrado que el sistema mínimo con actividad monooxigenasa, está formado de citocromo P450 y NADPH-citocromoP450 reductasa (Benveniste *et al.* 1991).

El contenido específico de P450 es generalmente bajo en tejidos vegetales no inducidos. En la mayoría de los casos el contenido de P450 puede ser incrementado considerablemente por diferentes tratamientos incluyendo lesiones (Benveniste *et al.*, 1977), o la exposición a la luz (Hendry y Jones, 1984), a metales (Fujita, 1985), a compuestos selectos (Zimmerlin y Durst, 1990) y a patógenos o secreciones fúngicas (Bolwell y Dixon, 1986).

Las evidencias de formas P450 múltiples en vegetales, aunque abrumadoras, son esencialmente fenomenológicas: (1) en una sola especie diferentes actividades dependientes de citocromos P450 son inducidas por diversos compuestos y con distintos tiempos (Reichhart *et al.*, 1979, 1980), (2) inhibidores (Reichhart *et al.*, 1982; Salaüm *et al.*, 1988), y triazoles (Rademacher *et al.*, 1987), selectivamente inhiben ciertas isoformas y (3) el mismo sustrato es oxidado con diferente regioselectividad en varias especies vegetales (Salaüm *et al.*, 1986; Karp *et al.*, 1990). Además, anticuerpos contra CA4H purificada de alcachofas de Jerusalén (Gabriac *et al.*, 1991), inhiben CA4H de todos los microsomas vegetales ensayados, pero no alteran algún otro P450 (Durst y Benveniste 1993).

La 4-hidroxilasa del ácido cinnámico, el principal P450 de vegetales ha sido clonado y la comparación de las secuencias presenta alta similitud con la enzima del aguacate y los citocromos P450 de las familias 17 y 2 de microsomas de mamíferos (Kalb y Loper 1988).

Hay una evidencia creciente de que los P450 juegan un papel activo en el metabolismo de los herbicidas y otros xenobióticos a compuestos inactivos. Se han acumulado pruebas de que en algunos casos los P450 pueden constituir el factor primario que proporciona esta tolerancia.

Casi 10 000 metabolitos secundarios vegetales han sido identificados. Muchos de estos compuestos son de interés agroquímico, farmacológico o biotecnológico. Presentan una amplia variedad de estructuras cuya síntesis puede involucrar numerosas etapas de oxigenación. Aunque las plantas tienen otros tipos de oxigenasas diversas (West, 1980). No hay duda de que muy pronto se caracterizarán nuevos genes que ayudarán a la comprensión de la evolución de la familia génica P450.

Reino Animal

Citocromo P450 monooxigenasas en crustáceos

Pocos investigadores han estudiado el sistema enzimático citocromo P450, así como su relación con la monooxigenación de xenobióticos en especies de crustáceos. Estudios *in vivo* han mostrado que los hidrocarburos son biotransformados a metabolitos polares por langostas (Little *et al.*, 1985, 1986), cangrejos (Lee *et al.* 1976) y zooplancton (Lee 1975). Ya que la primera etapa en biotransformación de hidrocarburos es la hidroxilación, los P450 están probablemente involucrados.

El hepatopáncreas es el sitio principal de monooxigenación de xenobióticos dependientes del citocromo P450. Las actividades de citocromo P450 y de monooxigenasas han sido reportadas en otros órganos incluyendo la glándula antenal y el estómago (James 1989).

En estudios de reconstitución con el citocromo P450 del hepatopáncreas de la langosta espinosa

se ha mostrado que los esteroides sexuales de vertebrados, progesterona y testosterona, son excelentes sustratos. La actividad fue encontrada con diversos xenobióticos incluyendo benzfetamina, aminopirina, benzo(a)pireno, etil-, bencil- y pentil-fenoxazonas y etoxicoumarina. Actividades más elevadas fueron encontradas para la *N*-desmetilación de benzfetamina y aminopirina (James 1989).

La capacidad de agentes que inducen P450 en vertebrados para producir P450 en crustáceos es aún incierta. Algunos estudios indican que hidrocarburos aromáticos policíclicos, pero no fenobarbital, pueden inducir P450 en estos organismos, mientras que en otros trabajos no se encuentran efectos con ninguno de los dos tipos de compuestos. Los crustáceos no son tan sensibles como los peces en la inducción de la actividad P450 y monooxigenasa.

Estudios recientes exponen que, aunque los crustáceos tienen un sistema monooxigenasa dependiente de P450, el mecanismo de acción detallado de este sistema puede diferir del de especies de vertebrados. No obstante que muchos de los mismos metabolitos oxigenados de xenobióticos son encontrados *in vivo* en crustáceos y vertebrados, no se ha demostrado aún la actividad de NADPH citocromo P450 reductasa en crustáceos, aunque sí se presenta una actividad baja de citocromo *c* reductasa.

La especificidad al sustrato de P450 de crustáceos ha sido estudiada en unas cuantas especies. En la langosta espinosa, las actividades más altas fueron encontradas con esteroides, benzfetamina y aminopirina, mientras que con dos especies de cangrejos la aminopirina y la etilmorfina fueron buenos sustratos. En mamíferos estos sustratos son metabolizados mejor por los citocromos en la familia P450₂ y las familias inducibles por esteroides (Nebert y González, 1987; González, 1989). Son necesarios mayores estudios para asignar a los principales P450 de crustáceos dentro de la nomenclatura corrientemente aceptada para la superfamilia P450.

Citocromo P450 en moluscos

Los citocromos P450 y los componentes asociados a actividades oxidantes de un sistema oxidasa de función múltiple (MFO) están localizados principalmente en los microsomas de las glándulas digestivas de los moluscos.

Los P450 y las presuntas actividades oxidantes catalizadas por P450, medidas *in vitro* y/o *in vivo*, han sido detectadas de forma diversa en 23 especies de moluscos.

Niveles generales de P450 microsómico en glándulas digestivas parecen ser similares para la misma especie de diversas poblaciones alrededor del mundo, sin embargo, se observaron diferencias con respecto a la estación, sexo y exposición a xenobióticos (Livingstone *et al.*, 1989).

La mayor cantidad de estudios de exposición a xenobióticos que han sido reportados, están dirigidos hacia compuestos solos o mezclas de contaminantes tales como diesel y petróleo crudo (Livingstone, 1987). A pesar de la carencia de respuestas, en algunas ocasiones, incrementos en el contenido específico de P450 microsómico y de la actividad de la NADPH-citocromo c reductasa de la glándula digestiva han sido consistentemente observados con la exposición a PHA y otros hidrocarburos.

La indicación más fuerte de la existencia de una isoenzima P450 particular en moluscos proviene de estudios moleculares en *M. edulis*, usando la hibridación de ARN total de la glándula digestiva a sondas de cADN de hígado de rata, las secuencias transcritas presentan homología al P4504A1 de rata (P450LAW o P-452). Esta isoenzima está involucrada en el metabolismo endógeno de ácidos grasos en el hígado de rata (Hawkins *et al.*, 1987) y se piensa que es un P450 antiguo, originado hace 800 millones de años (Nebert y González, 1987; Nelson y Strobel, 1987).

Muy poco puede ser concluido acerca de los P450 de moluscos. Se han indicado similitudes con los mamíferos y otros sistemas MFO (presencia de NADPH-actividad citocromo c(P450) reductasa, etcétera.), pero también hay diferencias que son evidentes.

Citocromo P450 en insectos

Sólo cinco cADNs de P450s y dos genes P450 han sido secuenciados (Feyereisen, 1993). La especificidad al sustrato de ninguna de estas proteínas P450 se conoce. Poco se sabe o se ha comentado sobre la filogenia molecular de los P450 de insectos, aunque la secuencia de tres miembros de la familia *CYP4* de insectos confirma un ancestro. La *CYP6* está más estrechamente relacionada a la *CYP3*, que se considera que precede la divergencia de las familias *CYP1* y *CYP2*.

El sistema monooxigenasa de insectos está involucrado en el metabolismo oxidante de sustratos endógenos y exógenos.

Las monooxigenasas parecen ser importantes en el desarrollo de insectos, como adaptación de insectos fitófagos y resistencia a pesticidas.

En estos organismos, un número cada vez mayor de funciones bioquímicas han sido atribuidas a este sistema, incluyendo el metabolismo de una amplia variedad de sustratos endógenos, tales como hormonas y la oxidación de muchos xenobióticos tales como plaguicidas y metabolitos secundarios de plantas. Las monooxigenasas de insectos parecen estar involucradas en muchos procesos diferentes con papeles importantes en el crecimiento y desarrollo, resistencia a insecticidas y en la interacción de insectos fitófagos con las plantas hospedadoras (Ronis y Hodgson, 1989).

Como en otros grupos animales, las monooxigenasas de insectos son encontradas en muchos tejidos y órganos (intestino medio, cuerpo graso y túbulos de Malpighi). A nivel subcelular, se encuentran tanto en el retículo endoplásmico (Gilbert y Wilkinson, 1974) como en las mitocondrias (Weirch *et al.*, 1985).

De manera similar a los mamíferos, el sistema monooxigenasa microsómico de insectos consiste de dos componentes, la flavoproteína NADPH citocromo P450 reductasa y la hemoproteína citocromo P450, esta última existiendo como múltiples isoenzimas que muestran un solapamiento en la especificidad al sustrato (Ronis y Hodgson, 1989).

Durante el ciclo de desarrollo de la mayoría de las especies de insectos, son observadas variaciones dramáticas en los niveles de P450 (Hodgson, 1985).

La importancia de las monooxigenasas mitocondriales en las conductas alimenticias fue demostrada por Krieger *et al.* (1971), quienes, examinando la actividad aldrín epoxidasa en preparaciones de intestino medio de larvas de 55 especies de lepidópteros, encuentran una actividad casi 10 veces incrementada en polípagos comparada con especies monofagas. Insectos oligofagos presentan valores intermedios. Esto muestra que existe una relación entre la actividad monooxigenasa y las interacciones con el alimento vegetal (Brattsten, 1979a,b).

Tal relación entre la actividad monooxigenasa y la dieta ha sido también presentada en otros grupos de animales (Walker *et al.*, 1986). La adaptación a productos vegetales secundarios contenidos en la dieta es indicada como la base para la rápida evolución de las debresoquina hidroxilasas (familia P4502D) en mamíferos (Skoda *et al.*, 1989).

Mucho del trabajo desarrollado en el pasado fue enfocado a la inducción de monooxigenasas de insectos por aloquímicos vegetales e indudablemente este es un importante mecanismo de desintoxicación en larvas de insectos durante su exposición inicial a los productos alimenticios vegetales en primera instancia. Sin embargo, la herencia de alteraciones en el patrón múltiple de isoenzimas P450 debe ser también un factor importante en la evolución de insectos polípagos, en la misma forma que la resistencia a plaguicidas es heredable en cepas de insectos.

El uso de sondas moleculares para el sistema monooxigenasa de insectos será necesario para estudios más detallados del papel de las isoenzimas P450 en la resistencia a pesticidas y para definir el lugar de los P450 de insectos en la evolución de la superfamilia multigénica P450.

Como en otros grupos animales, los P450 de insectos son inducidos por diferentes tipos de compuestos endógenos y exógenos. El fenómeno no ha sido estudiado con el mismo detalle, pero existe

cierta cantidad de similitudes y diferencias entre insectos y mamíferos en sus respuestas a inductores tradicionales de citocromo P450 en mamíferos. En éstos, el fenobarbital y los insecticidas ciclo-dienos inducen miembros de la familia 2 (Nebert y González, 1987). Ambos tipos de compuestos son también buenos inductores de P450 y P450-reductasa de insectos.

Citocromo P450 en peces

En teleósteos y elasmobranquios las enzimas microsómicas hepáticas catalizan una diversidad de reacciones monooxigenasa, consistentes con la presencia de formas P450 múltiples.

Un miembro de la familia P4501A inducible por hidrocarburos aromáticos está presente en todas las especies de peces examinadas hasta hoy. Esta proteína parece estar más relacionada a la P450 1A1. Algunas de las sondas inmunológicas para una P4501A1 de teleósteos, parecen ser anticuerpos reactivos, reconociendo la proteína homóloga en miembros de todos los grupos de vertebrados examinados (Stegeman, 1989).

Aunque la investigación sobre P450 de mamíferos continúa dominando la literatura, hay un crecimiento notable de la significancia biológica de los P450 en otros grupos de vertebrados y de la necesidad de conocer la diversidad y bioquímica de las formas P450 en estos grupos. Los peces presentan una diversidad extraordinaria y habitan virtualmente todos los nichos de agua dulce y salada del mundo. Además, representan una fuente importante de proteínas para el ser humano. El estudio de las formas P450 en peces así, adquiere importancia desde los puntos de vista evolutivo y toxicológico.

Las similitudes en las propiedades físicas y químicas así como en las funciones y las relaciones inmunológicas evidentes, identifican a las principales formas PHA inducibles en los diferentes grupos de vertebrados como proteínas homólogas.

Jaiswal *et al.* (1985) especulan que la divergencia de los genes P450 1A1 y P450 1A2 de mamíferos ocurre subsecuentemente a la divergencia

de las líneas de teleósteos y mamíferos. Si es así, el gen P450 1A1 de teleósteos podría estar ancestralmente relacionado a ambos genes de la familia P450 1A de mamíferos. Al respecto, el posible reconocimiento de ambas formas P450 1A1 y P450 1A2 de mamíferos por anticuerpos policlonales a P450 E de “scup” que se ha observado (Kloepper-Sams *et al.*, 1987), es consistente con (aunque no prueba) una relación ortóloga entre un único P450 de teleósteos y ambos miembros de la familia P450 1A de mamíferos. Heilmann *et al.* (1988) describen una similitud de 57-59% entre las secuencias del P₁450 de la trucha con uno u otro de los P4501A1 representativos de mamíferos y de 51-53 % de semejanza entre el P450 de la trucha con las diferentes formas P450 1A2 de mamíferos.

Asumiendo que el gen P4501A2 divergió de la línea génica P4501A1 después de la separación de la línea de mamíferos de los peces, entonces la presencia en peces de un gen P450 parálogo (Fitch, 1970) al P4501A1 de teleósteos y ortólogo al P4501A2 de mamíferos es inverosímil. En otras palabras, los peces podrían no tener una contraparte ancestral distinta para P4501A2.

La familia P4501A1 de teleósteos (P450E) es inducida por la mayoría de los compuestos que provocan estímulo en la familia P4501A1 en especies de mamíferos. Las similitudes estructurales y funcionales notables en las proteínas indican que la inducción de P4501A1 en teleósteos y mamíferos puede ocurrir por mecanismos similares. Sin embargo, hasta hoy existe poca evidencia que sustente esta sugerencia (Stegeman, 1989).

Una diferencia importante entre los P450 de peces y de mamíferos que continúa atrayendo la atención es la carencia de una clara inducción por FB o por inductores del tipo FB. Este fenómeno no está restringido a especies acuáticas, ya que algunos vertebrados no mamíferos incluyendo anfibios y reptiles (Schwenn y Mannering, 1982) carecen de tal inducción. Así, grupos terrestres y acuáticos importantes aparentemente han experimentado poca presión para evolucionar o mantener la sen-

sibilidad a inductores del tipo FB. La búsqueda de características comunes en estos grupos puede darnos una base para la carencia de la inducción por FB. Stegeman (1981) sugiere que la ausencia de estímulos por FB está relacionada con diferencias en el ambiente de productos naturales presentes en la dieta de grupos no sensibles a FB opuestos a los de grupos sensibles a FB, y plantean que los no sensibles generalmente carecen de material vegetal terrestre en sus dietas. Recientemente se sugiere que la radiación dentro de la familia génica P450 2 (que contiene las formas inducibles por FB P450 2B1 y 2B2) refleja una adaptación a la presencia de diversos productos vegetales en la dieta de mamíferos. Algunos autores, como Nelson y Strobel (1987) y Nebert y González (1987), apoyan esta sugerencia.

La escasez de información sobre la relación entre las formas P450 de teleósteos con respecto a su función P450 en otros grupos de vertebrados, particularmente mamíferos, se debe principalmente a la falta de análisis sistémicos con sondas específicas adecuadas. Una vez que las familias génicas P450 o subfamilias presentes en teleósteos hayan sido identificadas, entonces el establecimiento de la diversidad entre los miembros de estas familias llegará a ser de gran importancia evolutiva. Posiblemente muchas, aun la mayoría, de las diferentes familias génicas P450 descritas en mamíferos, estén representadas en peces, pero estas familias pueden contener menos miembros en muchos peces, como parece ser el caso para la familia P450 1A. Sin embargo, genes P450 nuevos se han originado en algunos grupos de peces que no tienen su contraparte ortóloga en mamíferos. La búsqueda de tales genes en las ramas de P450 y líneas de teleósteos será de interés.

Las monooxigenasas en anfibios reptiles y aves

La importancia de las monooxigenasas de vertebrados en el metabolismo de una enorme variedad de xenobióticos lipofílicos es ampliamente reconocida. Se sabe mucho más acerca de las monooxige-

nasa de mamíferos que de cualquier otro grupo de vertebrados tales como anfibios, reptiles o aves.

El conocimiento de las monooxigenasas de vertebrados inferiores generalmente es una parte esencial para la definición de la filogenia y evolución de este grupo de enzimas.

Las monooxigenasas microsómicas de hígado de reptiles y aves, como aquellas de peces, son fácilmente inducidas por el 3-metilcolantreno (MC) y por el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y mezclas de bifenilo policlorinado (PCB) (Walker y Ronis 1989). La inducción por MC también ha sido reportada en la rana leopardo y en la serpiente jarretera (Schwenn y Mannering, 1982).

Con inducción por FB, respuestas variables han sido reportadas en aves (Walker y Ronis, 1989). Los inductores del tipo FB son menos efectivos sobre aves que sobre mamíferos. En algunos casos no se observa efecto, en otros la inducción requiere dosis relativamente elevadas.

Brooker *et al.* (1983) han encontrado que FB, Dietoxicarbonil-1, 4-dihidrocollideno (DDC) y AIA, inducen el mismo citocromo P450 en el hígado de pollos. Se encontró una reacción cruzada con anticuerpos producidos para el P450 b (P450 2B1) de ratas. Así, éste fue referido como un ortólogo del principal P450 de la rata inducido por FB.

En individuos no tratados con agentes inductores, los niveles de actividades de P450 y de monooxigenasa para una variedad de substratos son generalmente más bajos en aves que en mamíferos de tamaño similar. Entre las aves, las actividades más bajas han sido encontradas en depredadores especializados, con herbívoros y omnívoros presentando las mayores actividades, una diferencia que puede reflejar los requerimientos diferenciales para la desintoxicación de xenobióticos lipofílicos en la comida. La diferencia entre aves y mamíferos no puede ser explicada en términos de la dieta, y presuntamente refleja diferencias genéticas, las cuales pueden o no estar relacionadas a requerimientos diferenciales de metabolismo endógeno.

Existe cierta evidencia de la existencia de ortólogos al P450c de rata (P4501A1). De acuerdo con la propuesta de Nebert y González (1987), esta es una forma primitiva presente en todos los grupos del Reino Animal, la cual presenta una secuencia de aminoácidos altamente conservada.

Citocromo P450 en mamíferos

La mayor parte del conocimiento acerca del P450 de eucariontes se ha originado de estudios con enzimas de mamíferos, principalmente aquellas derivadas de roedores y lagomorfos. Las razones de esto son bastante claras, ya que los P450 de mamíferos existen en concentraciones relativamente elevadas en tejidos como el hígado y muchos son inducibles por pretratamientos con xenobióticos, lo que facilita su aislamiento y caracterización.

Como se describió al principio de este trabajo, basados en las secuencias de aminoácidos de los citocromos P450, se ha construido un árbol evolutivo (Nelson y Strobel, 1987). Hay dos divisiones principales en este árbol filogenético: la primera ocurre en la separación de P450 de procariontes y eucariontes (aproximadamente hace 1400 millones de años), y la segunda divide las enzimas que catalizan el metabolismo de sustancias endógenas y de substratos exógenos (aproximadamente hace 100 millones de años). La primera duplicación génica hace 1360 millones de años da origen a los citocromos P450 en dos diferentes organelos celulares, a decir, las mitocondrias y el retículo endoplásmico.

De acuerdo con este análisis evolutivo, la historia antigua de los P450 de mamíferos parece estar relacionada con la evolución del colesterol, ya que las primeras secuencias de P450 eucarióticos son las enzimas mitocondriales que rompen la cadena lateral del colesterol.

Un aspecto estructural llamativo de los P450 es la presencia de un péptido altamente conservado alrededor de una cisteína que se encuentra en el extremo terminal carboxilo de la proteína con alrededor de 415 ± 15 residuos. Este péptido está bien conservado en diversos mamíferos (Gibson,

1989) y también aparece en el citocromo soluble de bacterias P450_{cam} derivado de *Pseudomonas putida*. Por analogía al P450_{cam}, este residuo cisteína se piensa que actúa como el quinto ligando del grupo prostético hemo (Poulos *et al.*, 1986, 1987).

FUTURO DE LAS INVESTIGACIONES

La estructura, función y regulación de los P450 de mamíferos están bien definidas (particularmente las isoenzimas de ratas, ratones y conejos), en comparación con estos sistemas nuestra comprensión de los citocromos P450 en especies inferiores está menos desarrollado, debido principalmente a la disponibilidad de pequeñas muestras biológicas y problemas relacionados con el manejo a gran escala. Estos impedimentos tradicionalmente han evitado el progreso en esta área, particularmente cuando se aplican a los enfoques clásicos de purificación de las proteínas y análisis de las actividades catalíticas. Sin embargo, con la actual disponibilidad de anticuerpos y sondas de genes para los P450 de mamíferos y la aplicación directa de la tecnología genética a sistemas inferiores se está apreciando un progreso sustancial en la comprensión de esta área.

CONCLUSIONES

Los P450 están representados en todos los fila y en diversas especies, desde bacterias hasta animales, y es razonable pensar que todas ellas tienen un ancestro común que data desde el origen de la vida. Además, este hecho es un reflejo de su importante papel en el mantenimiento de las funciones biológicas.

Los sistemas P450 mitocondriales son muy similares a algunos sistemas bacterianos, lo que sugiere que el primero deriva de un ancestro bacteriano, siendo esto una posible prueba de la teoría endosimbiótica del origen de los eucariontes, aunque más secuencias de P450 mitocondriales y bacterianos serán necesarias para corroborarlo.

La mayor parte del conocimiento acerca de los P450 se ha obtenido de los mamíferos terrestres

y éste se ha ido incrementando en algunos otros grupos (principalmente peces e insectos). Poco es conocido de otros vertebrados y mucho menos de los grupos de invertebrados. El interés en poder establecer las relaciones filogenéticas entre los diferentes reinos ha impulsado los estudios en grupos diversos a los de mamíferos, pero esto apenas comienza.

El papel de estas moléculas en el metabolismo de xenobióticos ha hecho que este grupo de enzimas sea uno de los más estudiados desde el punto de vista bioquímico con el propósito de establecer sus mecanismos de acción.

Los peces, los anfibios, los reptiles y las aves, no presentan o presentan poca capacidad para responder a inductores como el fenobarbital. Sería interesante poder profundizar más en este tipo de estudios y determinar la evolución de los mecanismos de regulación de los P450 y analizar la influencia que han tenido los hábitos alimenticios en las presiones evolutivas de esta superfamilia.

Por otra parte, la aparición de nuevos genes dentro de algunas especies y no en otras, durante el desarrollo evolutivo de los organismos, resulta de gran importancia en los estudios de toxicidad, así como de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis, empleados por las agencias reguladoras y compañías farmacéuticas, ya que los resultados obtenidos con una especie no podrán ser equiparables a lo que pueda suceder en otras, debido a diferencias en su acervo P450. Hasta ahora la rata ha sido el organismo más empleado en este tipo de análisis, pero se han encontrado diferencias en el metabolismo de las drogas entre humanos y ratas, debido a la presencia o ausencia de un gen P450 en particular en una de las dos especies. Por tal motivo, se debe considerar la búsqueda de un organismo más semejante al ser humano para este tipo de ensayos.

Es interesante observar que el acervo de P450 de diferentes especies es afectado por sus hábitos alimenticios, una base para el establecimiento de la hipótesis de la “guerra entre plantas y animales” como una de las causas de la gran diversidad de

P450 que ha surgido a raíz de la invasión de la tierra por parte de los animales.

Si llegásemos a comprender el funcionamiento de este complejo enzimático, en el futuro seríamos capaces de diseñar una prueba altamente sensible para determinar el riesgo genotóxico debido a desórdenes farmacogenéticos y, desde el punto de vista económico, se podrían diseñar nuevas drogas o productos

REFERENCIAS

- Appleby C.A. 1967. "A soluble hemoprotein P-450 from nitrogen-fixing *Rhizopium bacteroids*". *Biochem. Biophys. Acta* 147: 399-402.
- Attar R.M., Grotewold E., Tacciolo G.E., Aisemberg G.O., Torres H.N. y Judewicz N.D. 1989. "A cycloheximide-inducible gene of *Neurospora crassa* belongs to the cytochrome P-450 superfamily". *Nucleic Acid Res.* 17: 7535-7536.
- Benveniste I. Salauim J.P. y Durst F. 1977. "Wounding-induced cinnamic acid hydroxylase in *Jerusalem artichoke* tuber". *Phytochem.* 16: 69-73.
- Benveniste I. Lesot A., Hasenfratz M.P., Kochs G. y Durst F. 1991. "Multiple forms of NADPH cyt P450 reductase in higher plants". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117: 105-112.
- Bolwell G.P. y Dixon R.A. 1986. "Membrane-bound hydroxylases in elicitor-treated bean cells. Rapid induction of the synthesis of proyl hydroxylase and a putative cytochrome P-450". *Eur. J. Biochem.* 159: 163-169.
- Brattsten L.B. 1979a. "Biochemical defense mechanisms in herbivores against plant allochemicals". En: *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. G.A. Rosenthal y D.H. Ianzén (Eds.). Academic Press, Nueva York. pp. 199-270.
- Brattsten L.B. 1979b. "Ecological significance of mixed function oxidations". *Drug Met. Rev.* 10: 35-58.
- Breskvar K., Cresnar B., Hudnick-Plevnik T. 1987. "Resolution and reconstitution of cytochrome P-450 containing steroid hydroxylation system of *Rhizopus nigricans*". *J. Steroid Biochem* 26: 499-501.
- Brooker J.D., Srivastava G., Borthwick I.A., May B.K. y Elliot W.H. 1983. "Evidence that 2-allyl-2-isopropyl-acetamide, phenobarbital and 3,5-diethoxy-carbonyl-1, 4-dihydrocollidine, induce the same cytochrome P-450 in chick embryo liver". *Eur. J. Biochem:* 136: 327.
- Chen C., Kalb V.F., Turi T. y Loper J.C. 1988. "Primary structure of the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase gene from *Candida tropicalis*". *DNA* 7: 617-629.
- Desjardins A.E. y VanEtten H.D. 1986. "Partial purification of pisatin demethylase, a cytochrome P-450 from the pathogenic fungus *Nectria haematococca*". *Arch. Microbiol.* 144: 84-90.
- Durst F. 1991. "Physiology and biochemistry of plant cytochrome P-450 enzymes". En: Ruckpaul K. (Ed.) *Frontiers in Biotransformation*. Vol. 4. Akademie, Berlín.
- Durst F. y Benveniste I. 1993. "Cytochrome P450 in plants". En: *Cytochrome P450*. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 105. Springer-Verlag. pp. 293-310.
- Estabrook R.W. 1996. *The remarkable P450s: a historical overview of these versatile hemoprotein catalyst*. *FASEB J.* 10: 202-204.
- Ferris J.P., MacDonald L.H., Patrie M.A. y Martin M.A. 1976. "Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the fungus *Cunninghamella baineiri*: evidence for the presence of cytochrome P-450". *Arch. Biochem. Biophys.* 175: 443-452.
- Feyereisen R. 1993. "Cytochrome P450 in insects". En: *Cytochrome P450*. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 105. pp. 311-324.
- Fitch W.M. 1970. "Distinguishing homologous from analogous proteins". *System. Zoo.* 19: 99-113.
- Fujita M. 1985. "Stimulation of cytochrome P-450 synthesis in sliced sweet potato root tissue by chemicals applied to surface". *Agric. Biol. Chem.:* 49: 3045-3047.
- Gabriac B., Werck-Reichhart D., Teutsch H. y Durst F. 1991. "Purification and immunocharacter-

- ization of a plant cytochrome P450: the cinnamic acid 4-hydroxylase". *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 302-309.
- Gibson G.G. 1989. "Comparative aspects of mammalian cytochrome P450 IV gene family". *Xenobiotica* 19: 1123-1148.
- Gilbert M.D. y Wilinson C.F. 1974. "Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera*". *Pest. Biochem. Physiol.* 4: 56-66.
- González F.J. 1989. "The molecular biology of cytochrome 450s". *Pharmacol. Rev.* 40: 243-288.
- Graham-Lorence S. y Peterson J.A. 1996. "P450s: structural similarities and functional differences". *FASEB J.* 10:206-214.
- Hawkins, J.M., Jones W.E., Bonner F.W. y Gibson G.G. 1987. "The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal, and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney". *Drug Met. Rev.* 18: 441-515.
- Heilmann L.J., Sheen Y.Y., Bigelow S.W. y Nebert D.W. 1988. "Trout P4501A1:cDNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance". *DNA* 7: 379-387.
- Hendry G.A.F. y Jones O.T.G. 1984. "Induction of cytochrome P-450 in intact mung bean". *New Phytol.* 96: 153-159.
- Hodgson E. 1985. "Microsomal monooxygenases". En: *Complete Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 11. G.A. Kerkut y Gilbert L.I. (Eds.). Pergamon Press, Oxford. pp. 225-321.
- Hodgson E., Rose R.L., Goh D.K., Rock G.C. y Roe R.M. 1993. "Insect cytochrome P-450: metabolism and resistance to insecticides". *Biochem. Soc. Trans.* 21: 1060-1065.
- Holton T.A., Brugliera F., Lester D.R., Tanaka Y., Hyland C.D., Menting J.G., Lu C.Y., Farcy E., Stevenson T.W. y Cornish E.C. 1993. "Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower color". *Nature* (Londres) 366: 276-279.
- Jaiswal A.K., González F.J. y Nebert D.W. 1985. "Human dioxin-inducible cytochrome P-450: complementary DNA and amino acid sequences". *Science* 228: 80-83.
- James M.O. 1989. "Cytochrome P450 monooxygenases in crustaceans". *Xenobiotica* 19: 1063-1076.
- Kalb V.F. y Loper J.C. 1988. "Proteins of eight eukariotic cytochrome P-450 families share a segment region of sequence similarity". *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 85: 7221-7225
- Kalb V.F., Loper J.C., Dey C.R., Woods C.W. y Sutter T.R. 1986. "Isolation of a cytochrome P450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*". *Gene* 45: 237-245.
- Kalb V.F., Woods C.W., Turi T.G., Dey C.R., Sutter T.R. y Loper J.C. 1987. "Primary structure of the P450 lanosterol demethylase gene from *Saccharomyces cerevisiae*". *DNA*: 6: 529-537.
- Käppeli O. 1986. "Cytochromes P-450 of yeast". *Microbiol. Rev.* 50: 244-258.
- Karp F., Mihalaik C.A., Harris J.L. y Croteau R. 1990. "Monoterpene biosynthesis: specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*) and perilla (*Perilla frutescens*) leaves". *Arch. Biochem. Biophys.* 276: 219-226.
- Katagari M., Ganguli B.N., y Gunsalus I.C. 1968. "A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation". *J. Biol. Chem* 243: 3543-3546.
- Kim B.H. y Fulco A.J. 1983. "Induction by barbiturates of a cytochrome P-450-dependent fatty acid monooxygenase in *Bacillus megaterium*: relationship between barbiturate structure and inducer activity". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 843-850.
- Kloepper-Sams P.J., Park S., Gelboin H. y Stegeman J. 1987. "Immunochemical specificity and cross-reactivity of monoclonal and polyclonal antibodies to cytochrome P-450E of the marine scup". *Arch. Biochem. Biophys.* 253: 268-278.
- Kreiger R.I., Fenny P.P. y Wilkinson C.F. 1971. "Detoxification enzymes in the guts of cater-

- pillars: an evolutionary answer to plant defenses". *Science* 172: 579-581.
- Lai M.H. y Kirsch D.R. 1989. "Nucleotide sequence of cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14 α -demethylase) from *Candida albicans*". *Nucleic Acid Res.* 17: 804.
- Lee R.F. 1975. "Fate of petroleum hydrocarbons in marine zooplankton". En: *Proceedings of the 1975 Conference on Prevention and Control of Oil Pollution* (Washington DC, American Petroleum Institute). pp. 549-553.
- Lee R.F., Rayn C. y Neuhauser M.L. 1976. "Fate of petroleum hydrocarbons taken up from food and water by the blue crab, *Callinectes sapidus*". *Mar. Biol.* 37: 363-370.
- Lindemayer A. y Smith L. (1964). "Cytochromes and other pigments of baker's yeast grown aerobically and anaerobically". *Biochem. Biophys. Acta* 93: 445-461
- Little P.J., James M.O., Pritchard J.B. y Bend J.R. 1985. "Temperature-dependent disposition of (¹⁴C)-benzo(a)pyrene in the spiny lobster, *Panulirus argus*". *Toxic. App. Pharm.* 77: 325-333.
- Little P.J., James M.O., Foureman G.L., Weatherby R.P. y Bend J.R. 1986. "1-¹⁴C-*n*-hexadecane disposition in the spiny lobster *Panulirus argus* and the american lobster, *Homarus americanus*". *J. Environ. Pharm. Toxic. Onc.* 6: 13-28.
- Livingstone D.R. 1987. "Seasonal responses to diesel oil and subsequent recovery of the cytochrome P-450 monooxygenase system in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and the periwinkle, *Littorina littorea* L". *Sci. T. Environ.* 65: 3-20.
- Livingstone D.R., Kirchi M.A. y Wiseman A. 1989. "Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in mollusks". *Xenobiotica* 19: 1041-1062.
- Madhyasta K.M., Bhattacharya P.K. y Vaidyanathan C.S. 1977. "Metabolism of a monoterpene alcohol, linalool, by a soil Pseudomonad". *Can. J. Microbiol.* 23: 230-239.
- Matsuoka M. Miyakoshi S., Tanzawa K., Nakahara K., Hosobuchi M. y Serizawa N. 1989. "Purification and characterization of cytochrome P-450_{sca} from *Streptomyces carbophilus*". *J. Biochem.* 707-713.
- Miura Y. y Fulco A.J. 1974. "(ω -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium*". *J. Biol. Chem.* 249: 1880-1888.
- Miura Y. y Fulco A.J. 1975. " ω -1, ω -2, ω -3 hydroxylation of long chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium*". *Biochem. Biophys. Acta*: 388: 305-317.
- Müller H.G., Schunck W.H., Riege P. y Honeck H. 1984. "Cytochrome P-450 of microorganisms". En: *Cytochrome P450*. K. Ruckpaul y H. Rein (Eds.). Akademie, Berlín. p. 337.
- Nahri L.O. y Fulco A.J. 1982. "Phenobarbital induction of a soluble cytochrome P-450-dependent fatty acid monooxygenase in *Bacillus megaterium*". *J. Biol. Chem.* 257: 2147-2150.
- Nahri L.O. y Fulco A.J. 1986. "Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*". *J. Biol. Chem.* 261: 7160-7169.
- Nahri L.O. y Fulco A.J. 1987. "Identification and characterization of two functional domains on cytochrome P-450_{BM-3}, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*". *J. Biol. Chem.* 262: 6683-6690.
- Nebert D.W. y González F.J. 1987. "P-450 genes: structure, evolution and regulation". *Ann. Rev. Biochem.* 56: 945-993.
- Nebert D.W., Nelson D.R., Coon M.J., Estabrook R.W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., González F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Loper J.C., Sato I.R., Waterman M.R. y Waxman D.J. 1991. "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature". *DNA Cell Biol.* 10: 1-14
- Nelson D.R. y Strobel H.J. 1987. "Evolution of cy-

- tochrome P-450 proteins". *Molec. Biol. Evol.* 4: 572-593.
- O'Keefe D.P., Romesser J.A. y Leto K.J. 1987. "Plant and bacterial cytochrome P-450: involvement in herbicide metabolism". *Recent. Adv. Phytochem* 21: 151-173.
- Ohkuma M., Tanimoto T., Yano K. Y Takagi M. 1991. "CYP52 (Cytochrome P450_{alk}) multigene family in *Candida maltosa*, molecular cloning and nucleotide sequence of two tandemly arranged genes". *DNA Cell Biol.* 10: 271-282.
- Omer C.A., Lenstra R., Litle P.J., Dean C., Tepperman J.M., Leto K.J., Romesser J.A. y O'Keefe D.P. 1990. "Genes for two herbicide-inducible cytochromes P-450 from *Streptomyces griseolus*". *J. Bacteriol.* 172: 3335-3345.
- Ouzonis C.A. y Melvin W.T. 1991. "Primary and secondary structural patterns in eukaryotic cytochrome P-450 families correspond to structures of the helix-rich domain of *Pseudomonas putida* P-450_{cam}". *Eur. J. Biochem.* 198: 307-315.
- Poulos T.L., Finzel B.C. y Howard A.J. 1986. "Crystal structure of substrate-free *Pseudomonas putida* cytochrome P-450". *Biochem.* 25: 5314-5322.
- Poulos T.L., Finzel B.C. y Howard A.J. 1987. "High resolution crystal structure of cytochrome P450_{cam}". *J. Mol. Biol.* 195: 687-700.
- Redemacher W., Fritsch H., Graebe J.E., Sauter H. y Jung J. 1987. "Tetacyclacis and triazole type plant growth retardants: their influence on the biosynthesis of gibberellins and other metabolic processes". *Plant Sci.* 21: 241-252.
- Reichhart D., Salaüm J.P., Benveniste I. y Durst F. 1979. "Induction of manganese, ethanol, phenobarbital and herbicides of microsomal cytochrome P-450 in higher plant tissues". *Arch. Biochem. Biophys.* 196: 301-303.
- Reichhart D., Salaüm J.P., Benveniste I. y Durst F. 1980. "Induction of cytochrome P-450, NADPH cytochromo *c* reductase and cinnamic acid 4-hidroxylase by manganese, ethanol, phenobarbital and herbicides in higher plants". *Plant Physiol.* 66: 600-606.
- Reichhart D., Simon A., Durst F., Mathews J.M. y Ortiz de Montellano P.R. 1982. "Autocatalytic inactivation of plant cytochrome P-450 enzymes I. Selective inactivation of cinnamic acid 4-hidroxylase from *Helianthus tuberosus* by 1-aminobenzotriazole". *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 522-529.
- Reuttinger R.T. Wen L.P. y Fulco A.J. 1989. "Coding nucleotide 5' regulatory, and deduced acid sequences of P-450_{BM-3}, a single peptide cytochrome P-450: NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*". *J. Biol. Chem* 264: 10987-10995.
- Ronis M.J.J. y Hodgson E. 1989. "Cytochrome P-450 monooxygenases in insects". *Xenobiotica* 19: 1077-1092.
- Salaüm J.P., Simon A. y Durst F. 1986. "Specific induction of lauric acid ω -hidroxylase by colibrate, diethylhexyl-phthalate and 2,4-dichlorophenoxyacetix acid in higher plants". *Lipids* 21: 776-779.
- Salaüm J.P., Simon A., Durst F., Reich N.O. y Ortiz de Montellano P.R. 1988. "Differential inactivation of a plant lauric acid ω - and in-chain-hidroxylase by terminally unsaturated fatty acids". *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 540-545.
- Sanglard D. y Käppeli O. 1993. "Cytochrome P-450 in unicellular organisms". En: *Cytochrome P450. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 105. Springer-Verlag. pp. 325-349.
- Sanglard D. y Loper J.C. 1989. "Characterization of the alkane-inducible cytochrome P450 (P450 alk) gene from the yeast *Candida tropicalis*: identification of a new P450 gene family". *Gene* 76: 121-136.
- Sanglard D., Chen C. y Loper J.C. 1987. "Isolation of the alkane inducible P450 (P450 alk) gene from the yeast *Candida tropicalis*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 251-257.
- Sariaslani F.S. y Kuns D.A. 1986. "Induction of cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141: 405-410.

- Schunk W.H., Kärger E., Gross B., Wiedman B., Mauersberger S., Köpke K., Kiessling U., Strauss M., Gaestel M. y Müller H.G. 1989. "Molecular cloning and characterization of the primary structure of the alkane hydroxylating cytochrome P-450 from the yeast *Candida maltosa*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 843-850.
- Schwalb H., Nahari L.O. y Fulco A.J. 1985. "Purification and characterization of phenobarbital-induced cytochrome P-450_{BM-1} from *Bacillus megaterium* ATCC 15481". *Biochem. Biophys. Acta*: 838: 302-311.
- Schwenn R. J. y Mannering G.J. 1982. "Hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase system of the trout, frog and snake. III. Induction". *J. Comp. Biochem. Physiol.* 71B: 445-453.
- Seghezzi W., Sanglard D. y Fiechter A. 1991. "Characterization of a second alkane-inducible cytochrome P450-encoding gene, CYP52A2, from *Candida tropicalis*". *Gene* 106: 51-60.
- Shoun H., Sudo Y., Seto Y. y Beppu T. 1983. "Purification and properties of a cytochrome P-450 of a fungus, *Fusarium oxysporium*". *J. Biochem.* 94: 1219-1229.
- Skoda R.C., González F.J. y Meyer D.A. 1989. "Identification of mutant alleles of the P-450DB1 gene associated with deficient metabolism of debrisoquine". En: *Cytochrome P450 Biochemistry and Biophysics*. I. Schuster (Ed). Taylor & Francis, Londres. pp. 564-567.
- Stegeman J.J. 1981. "Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment". En: *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*. H.G. Gelboin y P.O.P. Ts'o (Eds.). Academic Press, Nueva York.
- Stegeman J.J. 1989. "Cytochrome P450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities". *Xenobiotica* 19: 1093-1110.
- Stegeman J.J. y Kloepper-Sams P.J. 1987. "Cytochrome P-450 isozymes and monooxygenase activity in marine animals". *Environ. Health Perspect.* 71: 87-95.
- Stegeman J.J. y Lech J.J. 1991. "Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure". *Environ. Health Perspect.* 90: 101-109.
- Stewart C.B. y Schuler M.A. 1989. "Antigenic cross-reactivity between bacterial and plant cytochrome P-450 monooxygenases". *Plant Physiol.* 90: 534-541.
- Sutter T. y Loper J.C. 1989. "Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for NADPH-cytochrome P450 reductase causes increased sensitivity to ketokonazole". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 1257-1266.
- Sutter T., Sanglard D. y Loper J.C. 1990. "Isolation and characterization of the alkane-inducible NADPH-cytochrome oxidoreductase gene from *Candida tropicalis*". *J. Biol. Chem.* 265: 16428-16436.
- Takagi M., Ohkuma M., Kobayashi N., Wanatabe M. y Yano K. 1989. "Purification of cytochrome P-450alk from *n*-alkane-grown cells of *Candida maltosa*, and cloning and nucleotide sequencing of the coding gene". *Agric. Biol. Chem.* 53: 2217-2226.
- Ullah A.J.H., Murray R.I., Battacharyya P.K., Wagner G.C. y Gunsalus I.C. 1990. "Protein components of a cytochrome P-450 linalool 8-methyl hydroxylase". *J. Biol. Chem.* 265: 1345-1351.
- Walker C.H. y Ronis M.J.J. 1989. "The monooxygenases of birds reptiles and amphibians". *Xenobiotica* 19: 1111-1121.
- Walker C.H., Newton I., Hallam S. y Ronis M.J.J. 1986. "Activities and toxicological significance of the hepatic microsomal enzymes of the kestrel and sparrowhawk". *Comp. Biochem. Physiol.* 86C: 359-363.
- Weirich G.F., Svoboda J.A. y Thompson M.J. 1985. "Ecdysone 20-monooxygenase in mitochondria and microsomes of *Manduca sexta* midgut: is dual localization real?". *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2: 385-396.

- West C.A. 1980. "Hydroxylases, monooxygenases and cytochrome P-450". En: *The Biochemistry of Plants*. R.K. Stumpf y Conn E.E. (Eds.). Vol. 2. Academic Press, Nueva York.
- Yabusaky Y., Murakami H. y Ohkawa H. 1988. "Primary structure of *Saccharomyces cerevisiae* NADPH-cytochrome P450 reductase deduced from nucleotide sequence of its cloned gene". *J. Biochem.* 103: 1004-1010.
- Yu C.A., Gunsalus I.C., Katagari M., Suhara K. y Takaemori S. 1974. "Cytochrome P-450_{cam}: I. Crystallization and properties". *J. Biol. Chem.* 249: 94-101.
- Zimmerlin A. y Durst F. 1990. "Xenobiotic metabolism in plants: aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 enzyme from wheat". *Phytochemistry* 29: 1729-1732.
- Zvelebil M.J.J.M., Wolf C.R. y Sternberg M.J.E. 1991. "A predicted three dimensional structure of human cytochrome P450: implications of substrate specificity". *Protein Eng.* 4: 272-282.

Control de un robot manipulador mediante señas gesticulares

Jesús Ornelas López¹, ^{1*}Édgar A. Martínez García²

RESUMEN

Se presenta el desarrollo de una interfaz hombre-máquina como alternativa a los sistemas de control convencionales (*joystick*, *data glove*), el cual, a través de un sistema de visión, reconoce las posturas de una mano para controlar un robot manipulador. La interfaz ofrece robustez y mayor cantidad de grados de libertad que en un *joystick*, por lo que pudiera ser utilizada en la medicina para el control de un manipulador asistente de cirujano. La interfaz incluye un sistema de visión por computadora para extraer las características de las posturas y el desarrollo de un clasificador (método de la media más cercana) que clasifica cada postura con alto grado de confiabilidad. La capacidad del sistema para controlar un manipulador es probado mediante simulación, los resultados obtenidos muestran que es robusto y eficaz. El diseño de la interfaz puede incrementar el número de posturas de la mano a reconocer para ampliar la flexibilidad del sistema.

1. INTRODUCCIÓN

La robótica es una rama de la ingeniería que se encarga de desarrollar sistemas avanzados basados en máquinas inteligentes y eficientes capaces de realizar tareas en los procesos industriales, de investigación, de exploración y en la medicina. Una clase de robots son los manipuladores o brazos mecánicos, que son máquinas que tienen movimiento pero que están fijas a una base y cuyo volumen de movilidad limitado. Tienen su principal aplicación en los procesos que sustituyen al hombre en la ejecución de trabajos donde se requiere mayor

velocidad y precisión o en procesos de riesgo o peligrosos para él.

Una de las maneras de mantener un control dinámico sobre un manipulador es por medio de un control manual, es decir, que un operador o usuario ordene directamente al robot los movimientos a ejecutar, ya sea para teleoperación (14) o para entrenamiento supervisado. Para este tipo de control, generalmente se utiliza un programa (5) o una interfaz física entre la máquina y el usuario, como lo son las palancas de mando (7), guantes con sensores (9) o hasta interfases que captan las señales electromagnéticas emitidas por el cerebro (1).

¹ Departamento de Ingeniería Industrial y Manufactura Instituto de Ingeniería y Tecnología. jesus.ornelas@uacj.mx

² Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. edmartin@uacj.mx

^{1*} Autor Responsable

Con las palancas de mando (*joystick*) o guantes con sensores (*data gloves*) necesariamente debe existir contacto entre el operador y la interfaz. Un atributo natural de esta modalidad es que el sistema evita el contacto físico entre el usuario y la interfaz para descartar posibles lesiones por movimientos repetitivos y mecanizados y reducir la cantidad de conexiones entre la interfaz y la computadora, además de contar con un grado suficiente de confiabilidad para lograr un control robusto y preciso del manipulador. Otra diferencia con el *joystick*, es que éste tiene una cantidad limitada de posiciones, mientras que el sistema propuesto cuenta con un mayor número de grados de libertad, ya que se pueden obtener más gestos y posturas de la mano que la cantidad de posiciones del *joystick*, los cuales se clasifican y traducen en un igual número de órdenes para un manipulador.

Por otro lado, la diferencia con respecto al *data glove* es que esta interfaz usa una gran cantidad de sensores para detectar las posiciones de los dedos y de la mano, característica que lo hace costoso. En cambio, en el sistema propuesto sólo se utiliza un sensor de visión, lo que evita tener cualquier contacto físico con la interfaz y se reduce la cantidad de conexiones y los puntos de fallas, lo cual lo hace más sencillo, robusto y más económico.

Uno de los enfoques que caracteriza al sistema es su desarrollo mediante el uso de tecnología de fácil adquisición y costo muy reducido. El perfeccionamiento, miniaturización y optimización de la Interfaz Hombre-Máquina (IHM) propuesta sugiere una contribución a la evolución de tecnología con posibilidades de usarse en un gran número de actividades cotidianas, por ejemplo, con posturas de la mano se podría encender electrodomésticos, regular la temperatura ambiente, controlar el televisor (6) o el encendido y apagado de las luces. En el área de la medicina, con una señal de la mano, un dentista podría controlar la posición de la silla y colocar al paciente en el lugar correcto para brindarle la atención necesaria. También podría ser utilizado en aplicaciones más delicadas como en

el control de un robot asistente de cirujano, con el cual los pacientes tendrían la oportunidad de ser intervenidos por médicos que no pueden estar físicamente presentes en el quirófano. Los médicos podrían estar en otra parte del mismo hospital, en otra ciudad o inclusive en otro país y ser asistidos por un sistema de visión y realizar cirugías controlando con gestos de las manos al robot asistente. La realización de esta investigación provee métodos que serían el núcleo para desarrollar en un futuro tecnologías accesibles, baratas, confiables y robustas al servicio de la sociedad para mejorar el estilo de vida de las personas en simples actividades de la vida diaria, en diferentes aplicaciones industriales, de seguridad, de investigación y biomédicas.

En este trabajo se desarrolla un sistema de control por visión que utiliza el método de la media más cercana para clasificar las posturas de una mano para traducirlas en comandos de movimientos de un manipulador. En la sección 3 se desarrolla una interfaz física compuesta por un sensor de visión con el cual las posturas de la mano son enviadas a la computadora. En la sección 4 se describe el proceso de sensado y adquisición de la postura o comando. En la sección 5 se describe el preprocesamiento y acondicionamiento de la imagen sensada para facilitar la extracción de características. En la sección 6 se discute cómo se implementa un extractor de características que son utilizadas para la clasificación de las posturas sensadas. En la sección 7 se implementa un clasificador para nueve clases o posturas diferentes: Detenerse, Sujetar, Soltar, Izquierda, Derecha, Arriba, Abajo, Adelante y Atrás. En la sección 8 se describe el entrenamiento supervisado al sistema para que sea capaz de interpretar y clasificar correctamente las posturas.

En tanto, en la sección 9 se realizan experimentos para probar el funcionamiento del sistema con un manipulador simulado en un programa de computadora. Finalmente, en las conclusiones, sección 10, se expresan los resultados obtenidos en esta investigación, así como los trabajos que se derivan para realizar en el futuro.

2. DEFINICIÓN DE POSTURAS

Las manos son partes del cuerpo que se utilizan principalmente para controlar y tener contacto físico con los objetos que se encuentran en el medio ambiente. A través de ellas también se puede sentir información como la temperatura o la textura de superficies de los cuerpos. Otro uso es el de gesticular, por lo que se pueden usar como medio para comunicarse con otras personas a través de señas, tal y como es utilizado el sistema LIBRAS en Brasil (10). En esta investigación, se recurre a un conjunto particular de gestos y posturas de la mano derecha para desarrollar un Interfaz Hombre-Máquina que permita la comunicación entre el usuario y el manipulador para controlar su posición y el accionamiento de su efector final. A diferencia del teclado, *mouse* o voz, las señas gesticuladas son otro medio que puede ser utilizado para comunicarse con las máquinas. Para el control del manipulador se definió una serie de posturas de la mano derecha, las cuales asocian un movimiento específico a ser ejecutado por el manipulador, éstas son mostradas en la Tabla 1.

3. INTERFAZ HOMBRE-MÁQUINA

En esta sección se describe la arquitectura del sistema desarrollado (Interfaz Hombre-Máquina, IHM), así como el proceso de sensado y el análisis de las imágenes adquiridas por el sensor.

3.1 Arquitectura

Se desarrolló un sistema de visión como medio para inducir los órdenes o comandos de control a un manipulador a través del reconocimiento de posturas de una mano. En la Figura 1 se presenta el esquema del sistema propuesto: un sensor de visión adquiere la imagen y una computadora extrae las características de la mano, las clasifica y traduce en una serie de estatutos y órdenes específicas para el manipulador, éste ejecuta la acción o movimiento señalado con la postura de la mano del usuario. Se seleccio-

no la modalidad de sensado mediante visión porque presenta ventajas sobre otras modalidades. Por ejemplo, el sensor es económico, se puede adquirir casi en cualquier parte, es fácilmente transportable, su operación es sencilla, ofrece mayor grado de libertad que otras interfaces y no hay contacto físico entre el usuario y la interfaz.






Posturas Definidas	
Postura	Comando
	Detenerse
	Sujetar
	Soltar
	Izquierda
	Derecha
	Arriba
	Abajo
	Adelante
	Atrás

Tabla 1. Posturas comando definidas para el control del manipulador

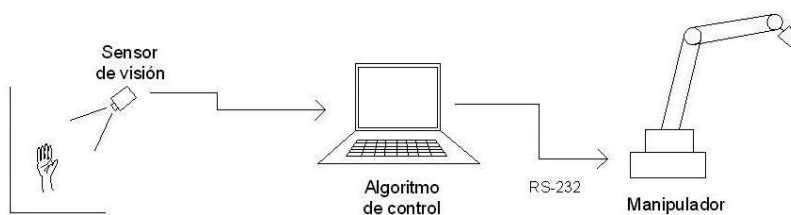


Figura 1. Sistema de control para un manipulador

La imagen adquirida se acondiciona para extraer algunas propiedades y finalmente las posturas se clasifican. La Figura 2 muestra la arquitectura a bloques del sistema desarrollado.

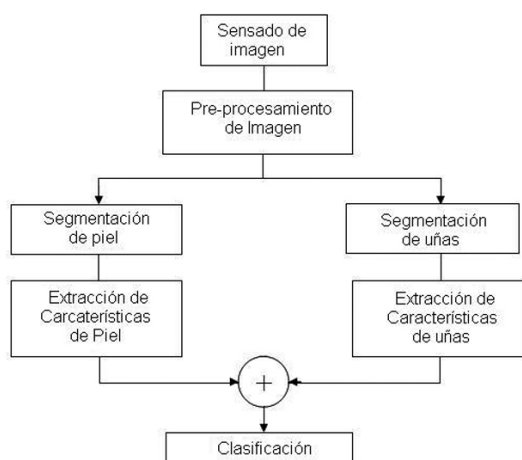


Figura 2. Estrategia para extracción de características de la imagen.

4. SENSADO

El proceso de sensado adquiere una imagen de la postura de la mano a través de un sensor de visión de bajo costo (webcam) colocado sobre una base (trípode). Existe un área delimitada como referencia para posicionar la mano dentro del campo de visión del sensor conteniendo únicamente la mano y el fondo de la imagen. La Figura 3 muestra un esquema del proceso de sensado.

En la presente arquitectura se utilizó un sensor de visión Ezonics, modelo EZ-368, conexión a la computadora por puerto USB 2.0, configurado para esta aplicación con una resolución de 320x240 píxeles.

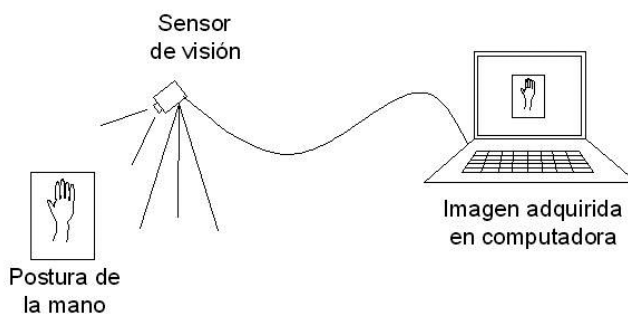


Figura 3. Adquisición de la imagen

Para sensar la mano dentro del campo de visión (FOV, por sus siglas del inglés: *Field of View*) del sensor, se usa como referencia y como fondo de la imagen, una plantilla de dimensiones 216 mm de ancho por 279 mm de largo. Se realizaron pruebas tomando imágenes de la mano con una plantilla de fondo de color blanco y otra de color negro para determinar las mejores condiciones para el proceso de segmentación. Con los resultados obtenidos de las pruebas se decidió utilizar el fondo negro porque ofrece algunas ventajas sobre el fondo blanco, entre ellas:

- a) El rango del color de la piel y de las uñas está más fácilmente separable del resto de los objetos.
- b) Disminuye elementos de ruido, es decir, componentes no deseados, como lo son sombras y brillos.

Se utilizó una computadora de capacidad estándar, con un procesador Intel Pentium M de 1.6

GHz y una memoria RAM de 512 MB, con sistema operativo Windows XP Professional. En la Figura 4 se muestra uno de los primeros experimentos para la adquisición de imágenes con el sistema de visión desarrollado.

La imagen adquirida con el sensor es una imagen a color. En (8) Garzón *et al.*, describen que las imágenes a color en un modelo RGB consisten en tres planos independientes, uno por cada color primario, estas tres se combinan en la pantalla para producir una imagen a color compuesta.



Figura 4. Sistema de visión.

En resumen, una imagen a color es una matriz de $m \times n \times 3$, donde m es la cantidad de renglones, n es la cantidad de columnas y 3 es por cada uno de los planos RGB. El sensor proporciona de forma nativa, las imágenes codificadas en RGB, sin embargo, para nuestro propósito éstas se procesan en escala de grises y en blanco y negro (binarizadas) para reducir la cantidad de datos relevantes y simplificar el proceso de análisis y extracción de características. En este trabajo, la imagen es convertida a tonos de grises y luego es binarizada y filtrada. Estos procesos son descritos en la siguiente sección.

5. PRE-PROCESAMIENTO

Primeramente, la imagen es acondicionada con el propósito de robustecer la extracción de las características que diferencian una postura de la otra.

Para ello, la imagen es convertida de colores a tonos de gris (ver Figura 5). A partir de esta imagen, el preprocesamiento consiste principalmente en dos pasos:

1. Proceso de binarización automático.
2. Proceso de filtrado espacial de ruido.



Figura 6. Imagen sensada y convertida a tonos de grises.

Mediante un proceso de binarización, se segmenta la región de la mano para separarla del fondo de la imagen, dado que en un histograma, estas son dos regiones claramente definidas. Existen varios métodos para segmentar imágenes y analizar las áreas de interés, tal como en (4) Coto, *et al.*, describe algunos métodos para la segmentación de imágenes médicas, de los cuales, la umbralización es también utilizada en este trabajo.

5.1 Binarización

En una imagen binaria es más fácil extraer características de tamaño y forma de un objeto que en una imagen a color o en tonos de gris, debido a que posee una cantidad reducida de datos relevantes. Dado que se configuró un fondo bien definido respecto al color de la mano, se utilizó de manera robusta un método para definir el valor de umbral automáticamente, conocido como método Otsu 10, descrito en la sección 5.2. La Umbralización es una técnica de segmentación comúnmente empleada cuando hay una clara diferencia entre los objetos a extraer respecto del fondo en una imagen. Un um-

bral T es un nivel de gris que separa 2 regiones en la imagen: fondo y objetos. Al aplicar manualmente un umbral T , la imagen en escala de grises, $f(x, y)$, es binarizada etiquetando con '1' los píxeles correspondientes al objeto y con '0' aquellos que son del fondo.

Con un histograma de una imagen donde existe una clara diferencia entre el objeto de interés y el fondo, se puede determinar un umbral encontrando un punto intermedio que divida las dos modas. La Figura 6 muestra el histograma de la imagen de la Figura 5, donde pueden notarse claramente las modas pertenecientes al fondo y a la mano. También puede diferenciarse la mano de las uñas, éstas últimas se encuentran en la parte más clara de la escala del histograma.

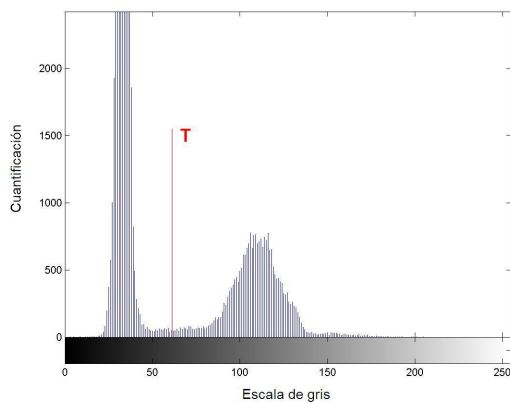


Figura 7. Histograma de tonos de grises de la imagen de la Figura 5.

5.2 Umbralización automática

La mayoría de las técnicas de umbralización se basan en estadísticas sobre el histograma unidimensional de una imagen. También se utiliza la matriz de co-ocurrencia de una imagen ¹⁰. Existen diferentes métodos para hallar un umbral. El método de Otsu es uno de los mejores métodos de selección de umbral para imágenes del mundo real. Este método hace una búsqueda exhaustiva para evaluar el criterio para maximizar la varianza entre clases. La importancia del método de Otsu radica en que es automático, es decir, no necesita supervisión humana ni información previa de la imagen antes de su procesamiento.

Una imagen es una función bidimensional de la intensidad del nivel de gris, y contiene N píxeles cuyos niveles de gris se encuentran entre 1 y L . En el caso de la umbralización en dos niveles, los píxeles son divididos en dos clases: C_1 con niveles de gris $[1, \dots, t]$ y C_2 , con niveles de gris $[t+1, \dots, N]$. Se desarrolló un algoritmo para seleccionar los objetos de interés, en este caso: la mano y las uñas, y extraer las características que servirán para reconocer cada gesto. Una de las tareas consiste en separar la mano del fondo de la imagen. En esta aplicación, se obtiene como resultado la segmentación de la mano del resto de la imagen usando el color blanco para el fondo y el color negro para la mano, el resultado es mostrado en la figura 7. La imagen presenta ciertos niveles de ruido y dificulta la tarea de extraer características deseadas; para acondicionar la imagen se aplica un filtro, el cual es descrito en la siguiente sección.



Figura 8. Imagen binarizada con el método Otsu.

5.3 Filtrado

El filtrado es un proceso mediante el cual se disminuyen los elementos de ruido que dificultan la extracción de características de una imagen o región. Para filtrar una imagen se utilizan operadores morfológicos o estructurales. El propósito de un elemento estructural es examinar si una región de una imagen tiene similitud con la forma y tamaño definido ¹⁰. Los operadores morfológicos se utilizan para preparar o filtrar una imagen para análisis posterior, con ellos se puede expandir, recortar, rellenar o detectar contornos de objetos dentro de

la imagen. En este trabajo, se utilizaron tres operaciones morfológicas las cuales son descritas en las siguientes secciones.

5.3.1 Definición de Nitidez.- Para incrementar la nitidez de los bordes de la mano, uno de los operadores utilizados para filtrar la imagen es el de mayoría. Con este operador, la imagen es examinada con un elemento estructural rectangular de 3x3 píxeles, el píxel analizado es puesto a 1 cuando mas del 50% de los píxeles vecinos son 1's. Con este proceso se eliminan píxeles aislados marcados con 1 y pone en 1 a los píxeles marcados con 0 y que están rodeados de 1's ("rellenar hoyos").

5.3.2 Aislado de Regiones.- La operación de erosión reduce una región de la imagen. La definición matemática de la erosión morfológica de una imagen B por el elemento estructural S es definida en 10 de la siguiente manera:

$$(1) \quad B \ominus S = \{b \mid b + s \in B \forall s \in S\}$$

El elemento estructural es deslizado por toda la imagen y cada vez que este cubre toda una región de 1's, el píxel que coincide con el origen del elemento estructural se transfiere a la imagen de salida, todos los demás se consideran píxeles binarios 0's, de esa manera, la imagen es erosionada. Mediante un elemento estructural rectangular de 3x3 píxeles, la imagen filtrada con el operador mayoría es erosionada con el de eliminar los píxeles aislados que se encuentran fuera de la región de la mano marcados con 1.

5.3.3 Agrandamiento de Características.- La operación de dilatación expande una región de interés de la imagen. La definición matemática de la dilatación morfológica de una imagen B por el elemento estructural S está dada de la siguiente manera:

$$(2) \quad S \oplus b$$

Esta operación es un operador de vecindad, el elemento estructural es deslizado por toda la imagen y cada vez que el origen del elemento estructural toca un píxel binario 1 cambia el valor de los píxeles que tienen vecindad con ese píxel y que está dentro del elemento estructural a 1's y lo envía a la imagen de salida, de esa manera, la imagen es dilatada. Con el operador Dilatación y también mediante un elemento estructural rectangular de 3x3 píxeles, la imagen es filtrada con el fin de restituir algunos píxeles pertenecientes al área de la mano eliminados en el proceso de erosión. Los resultados de aplicar los tres operadores a la imagen binarizada se muestra en la Figura 8.



Figura 9. Imagen filtrada.

6. EXTRACTOR DE CARACTERÍSTICAS

Para una clasificación correcta de los comandos expresados con la mano se deben obtener por anticipado un conjunto de características propias de cada región segmentada en las imágenes. Teniendo las regiones acondicionadas y libres de ruido, ahora es posible extraer ciertas propiedades o datos que proporcionan ayuda en el reconocimiento de patrones. En este proyecto se trabaja con algunas características de dos regiones: piel y uñas.

6.1 Región de la piel

En este proceso se definen las características que están relacionadas con tamaño y forma de la región de la mano, las propiedades a extraer de la región segmentada son el área de la región de la piel, el perímetro de la mano y el diámetro equivalente al área de la piel.

6.1.1 *Área.*- Una de las propiedades de la región segmentada es el área que ésta ocupa. Este es un buen parámetro a medir, dado que el área de la región de la piel es distinta en cada postura, lo que ayuda a diferenciar una postura de otra. Asumiendo como un píxel cuadrado, el píxel (r, c) , se define el área A de una región R como la suma de todos los píxeles cuyo valor es 1 y está representada por:

$$(3) \quad A = \sum_{(r,c) \in R} 1$$

6.1.2 *Perímetro.*- Otro proceso para adquirir las características de la postura de la mano es conocer la longitud del perímetro del área de la región segmentada. Este parámetro también proporciona datos diferentes para cada postura y es utilizado para diferenciar las posturas. Se define el perímetro de una región sin hoyos como el conjunto de píxeles que forman su borde interior. Un píxel es borde de una región si tiene vecindad con un píxel que está fuera de la región. Cuando una conectividad de 8 es usada para determinar si un píxel del interior de la región está conectado con uno fuera de la región, el resultado del conjunto de píxeles del perímetro es una conectividad de 4. Cuando una conectividad de 4 es usada para determinar si un píxel del interior de la región está conectado con uno fuera de la región, el resultado del conjunto de píxeles del perímetro es una conectividad de 8. Esto genera como resultado dos definiciones que complementan la ruta de los píxeles periféricos P_4 y P_8 , para conectividad 4 u 8:

$$P_4 = \{(r,c) \in R \mid N_4(r,c) - R \neq 0\}$$

y

$$P_8 = \{(r,c) \in R \mid N_8(r,c) - R \neq 0\}$$

Para calcular la longitud $|P|$ del perímetro P , los píxeles deben ordenarse en una secuencia $P = (r_0, c_0), \dots, (r_{k-1}, c_{k-1})$, cada par sucesivo de píxeles en la secuencia son vecinos, incluyendo el primero y el último. Entonces, la longitud del perímetro $|P|$ es definido por:

$$(4) \quad |P| = \left| \left\{ k \mid (r_{k+1}, c_{k+1}) \in N_4(r_k, c_k) \right\} \right| + \sqrt{2} \left| \left\{ k \mid (r_{k+1}, r_{k+1}) \in N_8(r_k, c_k) - N_4(r_k, c_k) \right\} \right|$$

donde $k+1$ es el módulo computado K , la longitud de la secuencia de píxel. Así pues, dos píxeles alineados horizontal o verticalmente en el perímetro, causa la adición del valor 1 al total, mientras que dos píxeles alineados diagonalmente causan la adición de alrededor del valor 1.4 al total. La Figura 9 muestra el perímetro de la región segmentada de una de las posturas.

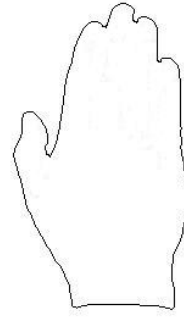


Figura 10. Perímetro de la imagen sensada.

6.1.3 *Diámetro Equivalente.*- El diámetro equivalente es un escalar y corresponde al diámetro de un círculo con la misma área que la región segmentada. Este es otro parámetro que contribuye para la clasificación correcta de las posturas, ya que proporciona valores que incrementan la separabilidad entre las posturas. El diámetro equivalente está dado por (5). La tabla 2 muestra un resumen de los promedios de las características morfológicas de cada una de las posturas definidas.

$$(5) \quad D = \sqrt{\frac{4 \sum_{(r,c) \in R} 1}{P}}$$

Características Morfológicas			
Postura	Área	Perímetro	Diámetro
Detenerse	24468.7	790.99	176.50
Sujetar	16979.8	557.61	147.03
Soltar	25956.9	1353.02	181.79
Izquierda	18206.7	663.55	152.25
Derecha	19074.5	711.69	155.84
Arriba	18444.6	688.02	153.25
Abajo	19194.5	771.74	156.33
Adelante	19818.1	687.4	158.84
Atrás	20061.1	671.72	159.82

Tabla 2. Valores promedio de las características morfológicas de la región de la piel (Área, Perímetro y Diámetro Equivalente).

6.2 Configuración de las uñas

Se tomó la decisión de trabajar con las características de las uñas, porque proveen combinaciones distintas de cantidad y posición entre ellas mismas y permiten definir una variedad de posturas que pueden ser utilizadas para diferentes comandos de control. Por otro lado, durante el desarrollo de este trabajo, los autores no encontraron literatura que tratara de trabajos relacionados con el reconocimiento de gestos de las manos en donde se tomara en cuenta la configuración de las uñas como característica para diferenciar los gestos. Esto representa una modalidad distinta a las antes estudiadas. En este proceso se tratan las características que tienen que ver con la relación geométrica entre las regiones pertenecientes a las uñas, las cuales son etiquetadas para cuantificarlas y para calcular la distancia que las separa entre ellas, estos datos proporcionarán ayuda para clasificar las posturas.

6.2.1 Segmentación de uñas

Uno de los procesos para obtener las características de la postura de la mano es contabilizar las uñas detectadas y conocer su relación geométrica. Para la binarización de las uñas se utilizó un umbral manual obtenido del histograma de la Figura 6, luego se pre-procesó mediante las técnicas mencionadas en la sección 5.3 para acondicionar la imagen y extraer las características importantes de ellas.

6.2.2 Conexión de componentes

Para extraer las características de las uñas, primeramente éstas son identificadas. Una manera de identificar los objetos en una imagen es mediante el etiquetado de componentes conectadas. Se define al etiquetado de componentes conectados de una imagen binaria B , como una imagen etiquetada LB en la cual el valor de cada píxel es la etiqueta de su grupo de componentes conectados. Una etiqueta es un símbolo único que nombra a una entidad. La etiqueta puede ser un carácter, sin embargo, es común y deseable que la etiqueta sea un número entero y positivo. Existen diferentes métodos para detectar la conexión de componentes en una imagen y marcarlos con una etiqueta que identifica al grupo al que pertenece; uno de los métodos es el recursivo. En la Figura 10 se ilustra el resultado de segmentar y etiquetar las uñas de la postura sensada.

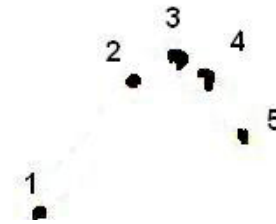


Figura 12. Total de uñas detectadas en una imagen sensada.

6.3 Distancias

En este proceso, primero se obtiene el centroide de cada uña, es decir, se localiza la posición de cada uña para posteriormente obtener la distancia media entre ellas. El centroide (\bar{r}, \bar{c}) de una región R es el promedio de la localización de sus píxeles y su representación se muestra en las ecuaciones 6.3 y 6.3. En la Tabla 3 se muestra la posición de cada uña detectada en la Figura 10 y que corresponde a la postura sensada.

$$(6) \quad \bar{r} = \frac{1}{A} \sum_{(r,c) \in R} r \quad \bar{c} = \frac{1}{A} \sum_{(r,c) \in R} c$$

$$(7) \quad \bar{c} = \frac{1}{A} \sum_{(r,c) \in R} c \quad \bar{r} = \frac{1}{A} \sum_{(r,c) \in R} r$$

Posición de las uñas		
Uña	X	Y
1	31.46	126.48
2	84.84	51.53
3	110.70	38.59
5	147.72	82.47

Tabla 3. Posición de uñas.

El centroide de cada uña detectada sirve como valor geométrico para calcular la distancia entre uñas. Esto se logra de la misma manera como se obtiene la distancia cartesiana entre dos puntos en el mismo plano. La distancia cartesiana descrita en Larson *et al.*, se menciona que para un triángulo rectángulo, de hipotenusa c y catetos a y b , se tiene que $c^2 = a^2 + b^2$. Éste teorema se adaptó para su uso en imágenes binarias donde c es la distancia entre los centroides de un par de regiones segmentadas representando las uñas y cuya longitud está dada en píxeles. La distancia d entre los píxeles (\bar{r}_1, \bar{c}_1) y (\bar{r}_2, \bar{c}_2) está dada por:

$$(8) \quad d = \sqrt{(\bar{r}_2 - \bar{r}_1)^2 + (\bar{c}_2 - \bar{c}_1)^2}$$

La Figura 11 muestra una imagen con las uñas segmentadas, con una marca del centroide de cada uña y una línea recta entre los centroides que representa la distancia entre ellas en la imagen sensada.

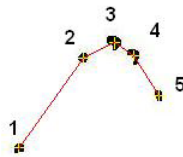


Figura 11. Distancia entre uñas.

En este trabajo se desarrolló un algoritmo que encuentra la distancia entre las uñas calculando la distancia entre los centroides de las uñas contiguas detectadas, aplicando el Teorema de Pitágoras bajo el siguiente esquema:

1. Si detectó solamente una uña, entonces la distancia se considera igual a 0. En esta aplicación se tiene un caso donde no aparecen uñas, y se

tienen 3 casos donde aparece 1 uña. Por lo tanto, la cantidad de uñas y la distancia promedio entre ellas son utilizadas para la clasificación de la postura.

2. Si detectó dos uñas, se obtiene una distancia denominada d_{1-2} . En esta aplicación se tienen 3 casos donde aparecen 2 uñas. Se toma esa distancia para la clasificar la postura.
3. Si detectó tres uñas, se obtienen dos distancias denominadas d_{1-2} y d_{2-3} . En esta aplicación no existen poses donde aparecen 3 uñas, sin embargo, se dejó esta operación para tener la oportunidad de utilizar esta condición y crear más posturas en aplicaciones futuras.
4. Si detectó cuatro uñas, se obtienen tres distancias denominadas d_{1-2} , d_{2-3} y d_{3-4} . Al igual que el inciso anterior, en ésta aplicación no existen poses donde aparecen 4 uñas. También se dejó esta operación para utilizar esta condición para crear más posturas en aplicaciones futuras.
5. Si detectó cinco uñas, se obtienen cuatro distancias denominadas d_{1-2} , d_{2-3} , d_{3-4} y d_{4-5} . En esta aplicación se tienen 2 casos donde aparecen 5 uñas. Por lo que se obtiene la distancia promedio entre ellas como característica para clasificar la postura.

En la Tabla 4 se muestra la media de las distancias entre los centroides de las regiones correspondientes a las uñas detectadas en cada una de las posturas definidas, obtenida en un experimento de 100 muestras de cada postura.

Características geométricas		
Postura	No. de uñas	d (píxeles)
Detenerse	5	44.17
Sujetar	0	0
Soltar	5	61.57
Izquierda	1	0
Derecha	1	0
Arriba	1	0
Abajo	2	96.11
Adelante	2	26.57
Atrás	2	30.44

Tabla 4. Características geométricas.

6.4 Vector de Características

Los objetos pueden ser comparados por similitud basada en su representación como un vector multidimensional. En esta aplicación, un vector de características es un conjunto de elementos que corresponden a las propiedades morfológicas y/o geométricas de una región. Un objeto puede ser representado por un vector x con d dimensiones, como el mostrado en la Figura 12.

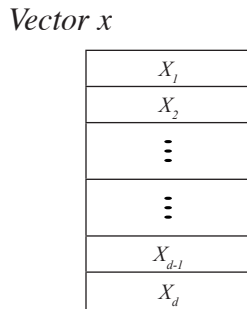


Figura 12. Vector de características.

Suponiendo que cada objeto es representado por exactamente d dimensiones, la i -ésima coordenada de su vector de características corresponde a la misma coordenada de la media de los objetos de una clase. El vector de características definido para este trabajo está compuesto por los valores de las características extraídas.

Los valores obtenidos de las características que ayudan a clasificar la postura son mostrados en la columna 3 (Valor) de la Tabla 5. Sin embargo, un problema se presenta cuando las características no tienen valores o escalas homogéneas, es decir, el vector contiene elementos con valores de decenas de millares, mientras que en otros, valores de sólo unidades. Por ejemplo, en el vector de características de la postura Detenerse, el valor del área de la mano es 24070, mientras que el de la cantidad de uñas detectadas es 5. Las escalas dificultan la separabilidad de las clases. Al calcular la distancia o separabilidad de los vectores, el área tendrá más peso que el resto de los elementos del vector de características y éstos no serán significantes. Para solucionar este problema, las dimensiones son esca-

ladas para dejarlas todas en una escala homogénea, en cantidades con dos dígitos (decenas), por lo que son multiplicadas por un factor que está indicado en la columna 4 (Factor) de la Tabla 5. Finalmente, el vector de características queda definido con los valores de la columna 5 (Valor final) de la Tabla 5.

Vector Característico				
d_i	Patrón	Valor	Factor	Valor Final
x_1	Área	24070	1/1000	24.07
x_2	Perímetro	786.66	1/100	78.66
x_3	Diámetro	175.06	½	87.53
x_4	Cantidad	5	1x10	50
x_5	Distancia	44.92	1	44.92

Tabla 5. Vector característico de la postura Detenerse.

7. CLASIFICADOR

Un clasificador es un dispositivo o algoritmo que tiene como entrada un conjunto de datos que representan un objeto, y la salida es una clase etiquetada que identifica el tipo de objeto (Figura 13). La clasificación es el proceso mediante el cual un objeto se etiqueta de acuerdo con sus propiedades. En esta sección se describe el desarrollo de un clasificador que determina cuál gesto o postura es emitido por la mano para ser interpretado en un comando para el robot manipulador.

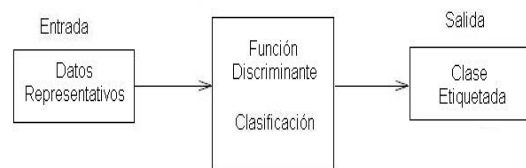


Figura 13. Esquema de un clasificador.

Para ello, se utiliza un vector de características con los valores extraídos a las propiedades de la región de una postura, como se describió a detalle en la sección 6. Para la clasificación se utiliza el método llamado la media más cercana, que ha resultado ser eficaz para reconocer las poses de la mano.

Una clase se define como el conjunto de objetos que tienen las mismas propiedades importantes

en común. El objeto que pertenece a una clase se denota con la misma etiqueta de clase. En este trabajo, una clase está representada por cada una de las posturas definidas en la sección 2. Por lo tanto, hay nueve clases.

7.1 Método de la media más cercana

Con la representación de un objeto mediante sus propiedades, es posible utilizar esa información para clasificarlo. Un clasificador puede construirse de diferentes maneras. El método de la media más cercana es un algoritmo sencillo y rápido que funciona bien como clasificador para clases compactas y bien separadas unas de otras.

La manera de clasificar es tomando una muestra de datos de cada clase para obtener un vector x_c de medias que represente a esa clase. Un objeto desconocido con vector de características x es comparado con el vector x_c de cada una de las clases; ese objeto es clasificado si está muy cerca a alguna media de una de las clases. Se puede decir que el sistema tiene entrenamiento supervisado. Usando varios objetos de la misma clase, se toman los valores de cada elemento de cada vector y se obtiene un valor promedio de ese elemento, luego, usando el promedio de los elementos se forma un vector de medias de características de la clase. Cuando un objeto desconocido es analizado, los vectores del objeto y de la clase son comparados para medir qué tan similares son o qué tan cercanos están. El proceso de comparación se hace con cada una de las clases definidas y se dice que el objeto pertenece a la clase que se localiza más cercanamente.

La importancia de tener un vector multidimensional de características de los objetos, es que con ello se incrementa la separabilidad o distancia espacial entre clases y facilita su clasificación. En la Figura 14 se muestra un modelo de tres clases con vectores de características tridimensionales. Se puede notar claramente la separabilidad entre las clases.

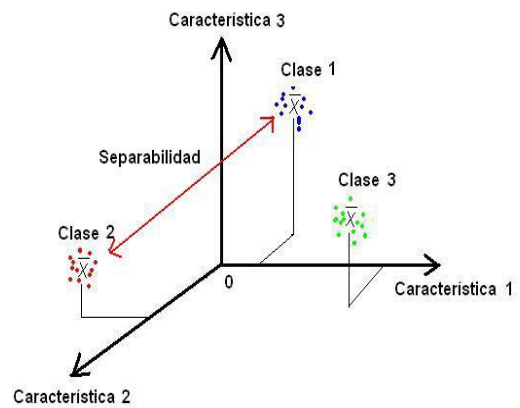


Figura 14. Medias de clases de valores experimentales.

Se realizó un experimento para cuatro clases, donde solamente se usaron tres características del vector con la finalidad de ilustrar gráficamente la localización de las clases definidas para este sistema en el espacio. Las características usadas fueron el área de la mano, su perímetro y el diámetro equivalente. Se tomaron 100 muestras de cada clase y se puede ver su uniformidad, se aprecia que espacialmente se encuentran lo bastante separadas para realizar la clasificación correcta. En la Figura 15 se muestra el resultado del experimento.

La similitud o cercanía entre los vectores de características de dos objetos puede describirse mediante la distancia euclidiana entre vectores definida en la ecuación 9. Es conveniente que esa medición sea real o un número de punto flotante para que facilite la comparación de la distancia entre el vector en cuestión y las medias de las clases. La distancia euclidiana usada en la media más cercana para dos vectores de características bidimensionales x_1 y x_2 es:

$$(9) \quad |x_1 - x_2| = \sqrt{\sum_{i=1}^d [x_1(i) - x_2(i)]^2}$$

Las agrupaciones de vectores quedaron con dispersión de puntos comprimidos pero con separabilidad apropiada entre clases para la aplicación del método de la media más cercana.

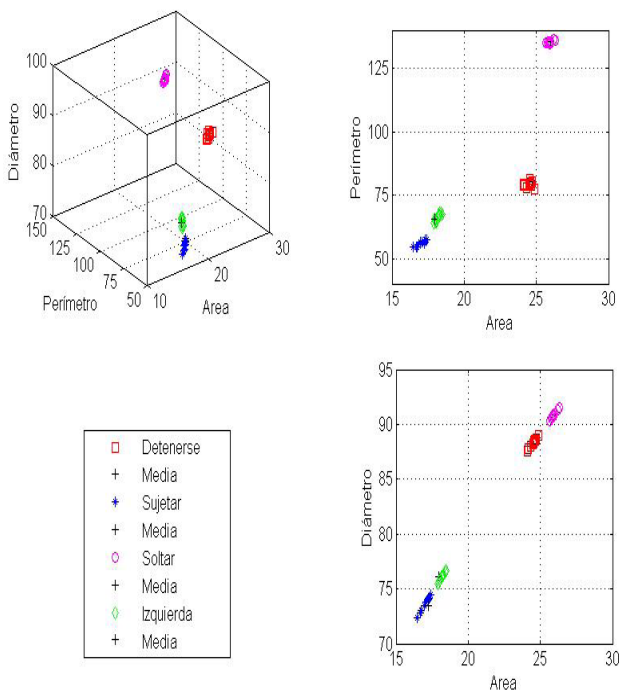


Figura 15. Localización espacial de las características de 4 clases.

8. ENTRENAMIENTO SUPERVISADO

En esta sección se presentan los resultados alcanzados durante la investigación aplicando los materiales y los métodos mencionados anteriormente a escenas reales. Se tomaron videos de los comandos y se analizaron con el algoritmo desarrollado. Se tomaron 300 muestras de cada uno de los coman-

dos y los resultados de la clasificación se muestran en Tabla 6. Los resultados arrojaron un alto grado de confiabilidad en posturas clasificadas correctamente, demostrando que el sistema es robusto y eficaz.

9. SIMULACIÓN Y CONTROL

Para demostrar la capacidad del sistema, se realizaron experimentos con un manipulador virtual utilizado para propósitos académicos y de investigación. Esta modalidad ofreció varias ventajas, entre ellas, que fue posible repetir el experimento un número sin fin de veces, además de ser más veloz en cuanto a aspectos de implementación y configuración durante el desarrollo, que experimentando con un manipulador real.

9.1 Descripción del manipulador

Se utilizó un simulador del robot *Puma 560* de 6 grados de libertad (DOF)¹ rotativas como el mostrado en la Figura 16. Se usaron utilerías de *Mat-LAB* especializadas en robótica (manipuladores) para la simulación y representación del robot 10 mediante una gráfica de 3D, como la mostrada en la Figura 17. Las articulaciones que se mueven para posicionar el efector final en un punto son las primeras tres.

Estadísticas del entrenamiento del sistema										
	Det	Suj	Sol	Izq	Der	Arr	Aba	Ade	Atr	Total
Posturas analizadas	300	300	300	300	300	300	300	300	300	2700
Posturas clasificadas correctamente	300	300	300	219	298	300	300	300	298	2615
Porcentaje de aciertos	100%	100%	100%	73%	98%	100%	100%	100%	98%	97%
Promedio del tiempo de cómputo por postura (seg)	0.217	0.183	0.230	0.187	0.230	0.217	0.217	0.193	0.220	0.208

Tabla 6. Resultados del entrenamiento.

¹ De sus siglas en inglés: Degrees Of Freedom

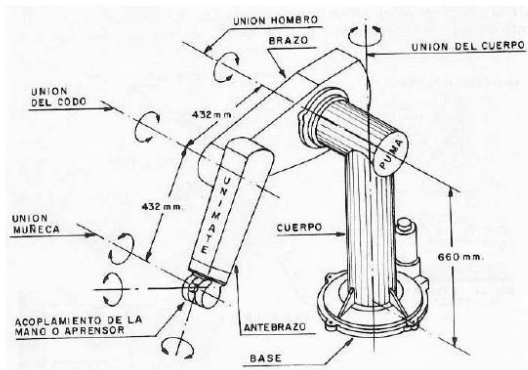


Figura 16. Morfología del robot Puma 560

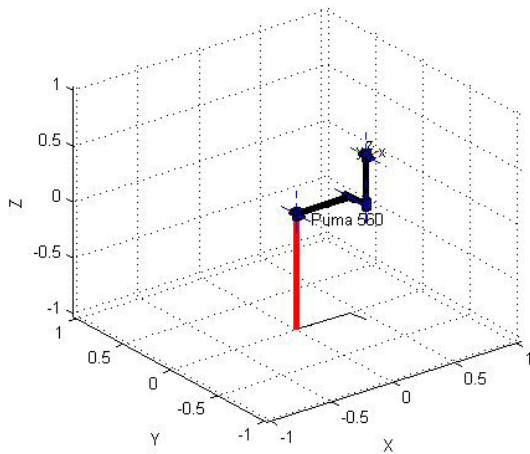


Figura 17. Visualización del ambiente virtual del robot Puma 560

El sistema clasifica la postura de la mano, y el comando reconocido es transferido al simulador, el cual, realiza el movimiento ordenado. Para ello, se crea un objeto en ambiente MatLAB con las características dinámicas y cinemáticas de un manipulador Unimation Puma 560, con el cual se pueden simular condiciones de operación del manipulador.

9.2 Comandos de Control

Para propósitos del desarrollo, los experimentos consistieron en adquirir videos reales, de 30 cuadros por segundo, con diferentes posturas de la mano y probar el control para el posicionamiento del manipulador mediante comandos de movimientos del robot en el plano formado por los ejes X, Y, y Z. El objetivo de la simulación fue probar la eficacia y la confiabilidad del sistema para controlar

el manipulador. Como ejemplo, en las siguientes figuras se muestra la interfaz gráfica del usuario con una secuencia de 6 movimientos del manipulador virtual, donde la Figura 18, es el último comando ejecutado (*Atrás*) y nuevo punto inicial. Enseguida se explica la secuencia de movimientos de las Figuras 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

1. Figura 18. Punto inicial de la secuencia.
2. Figura 19. El siguiente comando es *Arriba*, por lo que el efector final se desplaza en el eje $Z + \Delta Z$.
3. Figura 20. El siguiente comando es *Adelante*, por lo que el movimiento del efector final del manipulador es hacia el eje $Y + \Delta Y$.
4. Figura 21. El siguiente comando es *Izquierda*, por lo que el movimiento del efector final del manipulador es hacia el eje $X - \Delta X$.
5. Figura 22. El siguiente comando es *Arriba*, por lo que el movimiento del efector final del manipulador es hacia el eje $Z + \Delta Z$.
6. Figura 23. El siguiente comando es *Adelante*, por lo que el movimiento del efector final del manipulador es hacia el eje $Y + \Delta Y$.

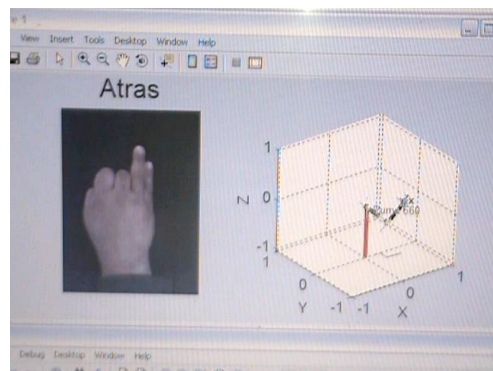


Figura 18. Movimiento I del robot.

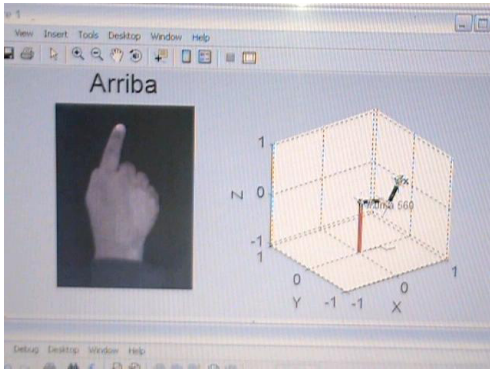


Figura 19. Movimiento 2.

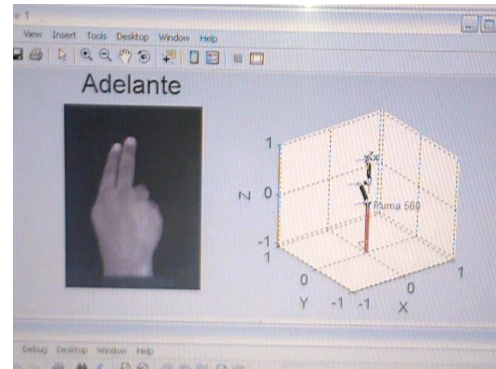


Figura 23. Movimiento 6.

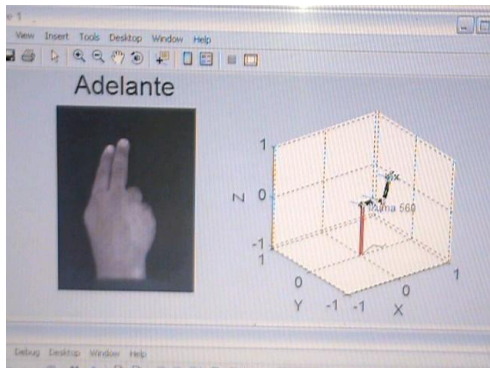


Figura 20. Movimiento 3.

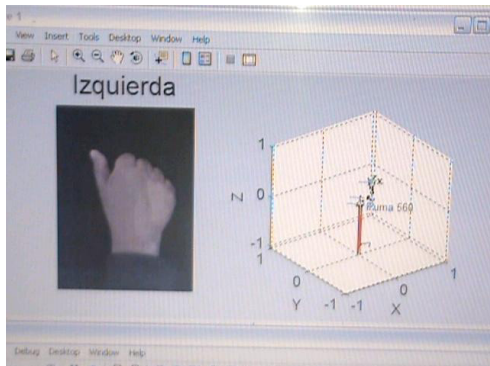


Figura 21. Movimiento 4.

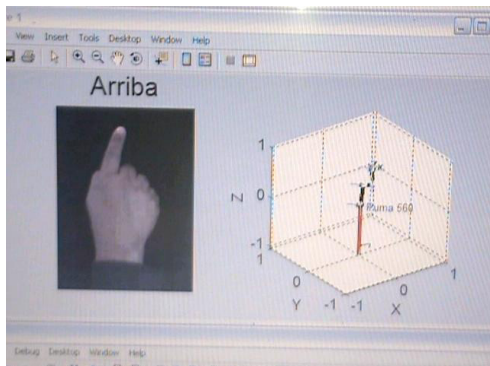


Figura 22. Movimiento 5.

10. CONCLUSIONES

Se desarrolló un sistema compuesto de un sensor de visión y un algoritmo de reconocimiento con el cual se puede controlar el posicionamiento del efector final de un manipulador mediante reconocimiento y clasificación de gestos y posturas de la mano.

Los resultados muestran un sistema robusto y eficaz, por lo que no solamente se puede controlar un manipulador. Con este sistema y a través de posturas de la mano también se podría entrenar un robot móvil para que avance, retroceda, gire a la izquierda o derecha.

Se desarrolló un sistema de pre-procesamiento de la imagen adquirida mediante operaciones morfológicas. La extracción de características consistió básicamente en dos tipos: morfológicas (mano) y geométricas (uñas). Se desarrolló un clasificador mediante el método de la media más cercana cuyo entrenamiento supervisado, estadísticamente, demostró ser confiable en más del 98% de las clasificaciones en 8 posturas registradas y el 73% en una postura. Sin embargo, este último porcentaje puede ser considerablemente mejorado incrementando la separabilidad entre posturas con la adición de nuevas características, o bien, cambiando el tipo de postura, ya que el sistema tiene la capacidad de incrementar el número de posturas para control.

El siguiente paso sería desarrollar interfaces computadora-dispositivo como herramienta para entrenar y controlar otro tipo de manipuladores, robots móviles u otras aplicaciones reales, en lugar de utilizar código de lenguaje de computadora.

Por otro lado, el sistema propuesto puede tener tantos grados de libertad como posturas o gestos puedan señalarse con la mano, lo que representaría un mayor número de comandos para un sistema. Por ejemplo, si el efector final del manipulador fuera un sensor de visión, se podría controlar la posición del sensor en un punto específico, el enfoque del objetivo y un dispositivo que proporcione la iluminación, todo con la misma interfaz desarrollada.

REFERENCIAS

- [1]. André Ferreira, Wanderley Cardoso Celeste, *et al.* *Desarrollo de interfaces para personas con discapacidad basadas en señales EMG y EEG*. Departamento de Engenharia Elétrica Universidade Federal do Espírito Santo Brasil.
- [2]. Cátedra Visión Artificial, Segmentación por Umbralización, Método Otsu. Universidad Nacional de Quilmas, Ingeniería en Automatización y Control Industrial, Octubre 2005.
- [3]. Corke, P. A. “Robotics Toolbox for Matlab”. *IEEE Robotics and Automation Magazine*, 3 (1996), 24-32.
- [4]. Coto, E. *Métodos de segmentación de imágenes Médicas*, Marzo 2003.
- [5]. Felipe A. de La Peña-Contreras, Antonio Cárdenas-Galindo, *et al.*, *Vision based control for industrial robots with interface on internet2*. Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México, 2005.
- [6]. Freeman, W. T., and Weissman, “Television control by hand gestures”. In *Automatic Face and Gesture Recognition* (1995).
- [7]. Joel Chestnutt, Philipp Michel, *et al.* *An intelligent joystick for biped control*. Robotics Institute Carnegie Mellon University.
- [8]. Johnson Garzón R., Arturo Plata G, *et al.* *Método policromático para la caracterización de imágenes metalográficas. Laboratorio de Óptica y Tratamiento de Señales*. Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, Bucaramanga Colombia, 2003.
- [9]. M. A. Diftler, R. Platt, *et al.* *Evolution of the nasa/darpa robonaut control system*. Robotics Technology Branch NASA Johnson Space Center.
- [10]. Pistori, H., and Neto, J. J. “An experiment on handshape sign recognition using adaptive technology: Preliminary results”. In *Lecture Notes in Artificial Intelligence* (2004).
- [11]. Roland E. Larson, Robert P. Hostler, B. H. E. *Cálculo y Geometría Analítica*, vol. 1. McGraw Hill, 1995, Capítulo 1, pp. 13-14.
- [12]. Shapiro, L., and Stockman, G. *Computer Vision*. Mar 2005, Capítulo 3, pp. 63-103.
- [13]. Shapiro, L., and Stockman, G. *Computer Vision*. Mar 2005, Capítulo. 4, pp. 107-144.
- [14]. Venema, S., and Hannaford, B. “Miniature telerobots in space applications”. In *Integrated Micro/Nanotechnology for Space Applications* (1995).

Factores a considerar en la digestibilidad *In Vivo* en rumiantes

Héctor González García ¹, Roberto Martínez de la Rosa ¹ y Hugo Enrique Hernández Contreras ²

RESUMEN

La digestibilidad se determina al medir la cantidad de alimento consumido y la cantidad de heces eliminadas después de que un animal ha tenido suficiente tiempo para acostumbrarse a una dieta. Las medidas convencionales de la digestibilidad han contribuido significativamente al desarrollo de sistemas que describen los valores nutritivos de los alimentos. La mayoría de los estudios de digestibilidad llevados a cabo para los alimentos utilizados en la alimentación de rumiantes han sido evaluados con ovinos, debido a que éstos son más fáciles de manejar y las cantidades de alimento y de excreta involucradas en las pruebas son más pequeñas con respecto a los bovinos.

INTRODUCCIÓN

Los experimentos que incluyen la digestión de los alimentos son muy útiles debido a la considerable cantidad de material indigestible que no es aprovechado por los rumiantes al utilizar los nutrientes. La medición de la digestibilidad se ha usado ampliamente como un índice básico para la estimación del valor nutricional de los alimentos (Mertens y Ely, 1982). La mayoría de los estudios de digestibilidad llevados a cabo para los alimentos utilizados en la alimentación de rumiantes han sido evaluados con ovinos, debido a que éstos son más fáciles de manejar y las cantidades de alimento y de excreta involucradas en las pruebas son más pequeñas con respecto a los bovinos.

Dichas razones económicas han ocasionado que los borregos sean utilizados como la base de los procedimientos de evaluación nutricional en rumiantes. El uso de borregos como un modelo experimental para rumiantes asume que las variaciones en el consumo y en el tipo de la dieta producen cambios similares en la cinética digestiva de bovinos y ovinos. La suposición de que estas especies no difieren desde un punto de vista nutricional se ha basado en trabajos desarrollados con animales alimentados con dietas altas en forrajes (Südekum *et al.*, 1995).

DIGESTIBILIDAD *IN VIVO*

La digestibilidad puede ser definida como los cons-

¹ Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Anillo PRONAF y Estocolmo s/n, Col. Progresista, Ciudad Juárez, Chihuahua, México. C. P. 32300. hgonzale@uacj.mx
² Universidad Autónoma de Baja California Sur.

tituyentes de la dieta que se pierden en el paso a través del tracto digestivo. En su forma básica, la digestibilidad se determina al medir la cantidad de alimento consumido y la cantidad de heces eliminadas después de que un animal ha tenido suficiente tiempo para acostumbrarse a una dieta. Las medidas convencionales de la digestibilidad han contribuido significativamente al desarrollo de sistemas que describen los valores nutritivos de los alimentos (Van Soest, 1994). Actualmente el sistema de energía neta representa la herramienta más útil para describir los requerimientos y los valores nutricionales de los alimentos (NRC, 2001).

De acuerdo al sistema clásico de partición de energía que provee la base para el sistema de energía neto, la mayor pérdida de energía durante la utilización de alimentos por rumiantes que consumen dietas basadas en forrajes es durante la eliminación de heces por el animal. Si bien la digestibilidad de la materia seca (MS) o de la materia orgánica (MO) no es estrictamente equivalente a la pérdida de energía fecal, se encuentra estrechamente relacionada. De hecho, la prueba de digestión convencional es una parte integral de la determinación de la energía digestible. Por lo tanto, debido a la magnitud de la pérdida de energía en las heces y su importancia en definir valores nutricionales, la medida de digestibilidad *in vivo* es una técnica fundamental que se debe entender ampliamente por aquellos que estudian la nutrición de rumiantes cuando éstos consumen dietas basadas en forrajes (McDonald *et al.*, 1995).

Cuando se han evaluado las diversas fuentes de error que pueden afectar los experimentos de digestión, se ha encontrado una considerable variación entre varios laboratorios al determinar los coeficientes de digestión en un mismo heno; reportándose en algunos casos que la variación entre laboratorios fue de tres a seis veces mayor que la variación dentro del mismo laboratorio. Uno de los factores que contribuyen más a que dichas diferencias se presenten, es la variabilidad en los procedimientos al llevar a cabo una prueba de digestión. Por dicho motivo, es fundamental utilizar una

metodología bien aceptada y estandarizada, tanto como sea posible, al llevar a cabo la estimación de la digestibilidad (Pond *et al.*, 2005).

LA PRUEBA DE DIGESTIÓN

Al planear un experimento de digestión, se deben de considerar las instalaciones y los materiales de colección. A partir del conocimiento de los factores que pueden influir el consumo y/o la digestión, se puede generalmente definir las condiciones óptimas de las instalaciones. Se conoce que los factores ambientales (temperatura, fotoperiodo, lodo, etc.) afectan el consumo y, en muchos casos, la digestibilidad (NRC, 2000). Por ello, las instalaciones más apropiadas para llevar a cabo las pruebas de digestión serán las que se encuentren completamente cerradas, en las cuales las variables medioambientales puedan ser controladas. La temperatura es probablemente el componente ambiental más crítico a controlar. Cuando la temperatura disminuye por debajo de la zona termoneutral, el consumo y la tasa de pasaje aumentan, mientras que la digestibilidad se reduce (Church, 1993).

Debido a que el fotoperiodo puede afectar el consumo (Grovm, 1993), se debe de mantener consistentemente un patrón de iluminación durante toda la prueba de digestión. El consumo es generalmente mayor en fotoperiodos más prolongados, no obstante, se ha reportado que las vaquillas consumieron más alimento cuando estuvieron sujetas a un periodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad con respecto a aquellas que tuvieron iluminación continuamente. Un patrón que abarca ciclos tanto de iluminación como de oscuridad, con proporcionalmente más luz que oscuridad cada 24 h, es más deseable. Lo anteriormente descrito excluye aquellos estudios diseñados expresamente para evaluar la digestión bajo condiciones de alimentación *ad libitum*, en donde el mantenimiento de un consumo adecuado y la prevención del rechazo del alimento son factores que deben considerarse al llevar a cabo una prueba de digestión. Una posible excepción a esta recomendación es cuando el protocolo expe-

rimental indica una colecta de muestras durante la noche, debido a que una exposición corta de iluminación durante la noche puede afectar el patrón de consumo. De acuerdo a los objetivos experimentales, se puede mantener a los animales bajo condiciones de iluminación continua para minimizar las desviaciones durante los periodos de muestreo nocturno (Peters *et al*, 1980).

Aparte de los requerimientos de las instalaciones, es muy importante considerar la forma de mantener alojados a los animales durante el periodo experimental. La mayoría de las pruebas de digestibilidad son llevadas a cabo con el animal como la unidad experimental y, por lo tanto, se requiere una colección cuantitativa tanto de la excreta como del consumo diario de cada animal. Lo anterior considera alojar a los animales en corrales individuales o corraletas “metabólicas” que permitan cierta libertad de movimiento. La forma de selección del alojamiento dependerá de la forma de colección de la excreta y del impacto del alojamiento sobre el consumo de alimento. El ejercicio, particularmente entre los periodos de colección de muestras puede ayudar a minimizar los problemas de comportamiento y el desarrollo de anormalidades en patas y pezuñas en los animales alojados en corraletas metabólicas. Asimismo, la selección de animales con un temperamento dócil y que éstos sean alojados en las jaulas metabólicas antes de la prueba de digestión, puede minimizar los problemas de consumo de alimento. Es conveniente considerar el material que conforma el piso de la jaula para proporcionarle el mayor confort al animal. La ventaja principal en la utilización de este tipo de corrales es el hecho que proveen un método eficaz para coleccionar la excreta y poder monitorear el consumo (Cheeke, 2004).

Un elemento importante para asegurar el éxito al llevar a cabo una prueba de digestibilidad es la selección de los animales con un comportamiento adecuado a este trabajo. Además, un entrenamiento adecuado de los animales seleccionados debe realizarse antes de iniciar el periodo experimental

para minimizar la perturbación del animal durante el mismo. La selección debe realizarse con animales jóvenes basados en una perceptible disposición cuando están sujetos a una rutina de manejo; siendo rechazados aquellos animales que no se adaptan fácilmente al manejo y son nerviosos durante la fase inicial. Los animales seleccionados deberán ser expuestos a condiciones similares a las que se implementarán en el experimento de digestibilidad. Este entrenamiento puede llevarse unos pocos días o varias semanas antes del inicio del experimento, dependiendo de la complejidad del mismo. Es altamente recomendada una selección de los animales con características lo más similares posibles entre ellos, esto incluye: especie, edad, sexo, estatus fisiológico, peso e historia nutricional previa (Kellems y Church, 2001).

Otra consideración más al seleccionar a los animales en los experimentos de digestibilidad es el número que se requiere de ellos. A través de estudios previos en relación a la cantidad de animales necesarios para estudios de digestibilidad con ovinos y bovinos, la cifra óptima se encuentra en un rango de tres a seis por tratamiento (Montgomery, 1991; Jurgens, 2001).

Un manejo adecuado de registros y el establecimiento de un horario rutinario son críticos para asegurar el éxito en el experimento de digestibilidad. Deberá establecerse un horario de colecta de datos y de alimentación antes de iniciar las pruebas de digestibilidad y todo el personal involucrado en el experimento deberá conocer y seguir dichos horarios. Una de las principales fuentes de error en la determinación de los coeficientes de digestión parte de una expulsión irregular de heces (error del “fin de periodo”). Por lo tanto, la irregularidad en los patrones de alimentación y la irregularidad en el tiempo de colección de heces pueden aumentar los errores de “fin de periodo” (Perry *et al*, 2002).

Los experimentos de digestibilidad consisten generalmente de dos fases, un periodo preliminar y un periodo de colección. El propósito del periodo preliminar es el de establecer el nivel de consumo,

asegurándose que todos los residuos de las dietas previas han sido eliminados del tubo gastrointestinal y además de permitir que la población microbiana ruminal tenga tiempo para adaptarse a la dieta sujeta a evaluación. En diversas situaciones, particularmente con cambios significativos en la dieta, será requerido más tiempo para que se lleve a cabo esta adaptación en la microflora ruminal (Van Soest, 1994). Existen numerosos reportes sobre la duración del periodo preliminar y el periodo de colección. Se sugiere que los periodos preliminares tengan una duración de entre 10 y 14 d (Merchen, 1993); no recomendándose llevar a cabo periodos preliminares de menos de 10 d (Van Soest, 1994).

El periodo de colección es el periodo en el cual el alimento y la excreta se colectan cuantitativamente. Generalmente, se ha observado que los errores del “fin de periodo” se reducen significativamente con periodos de colección más largos (Perry *et al*, 2002). En los reportes experimentales se sugiere que el tiempo de colecta se debe de llevar a cabo durante un periodo de cinco a 10 d (Merchen, 1993; Van Soest, 1994), siendo el más adecuado un periodo de colección de siete días (Van Soest, 1994).

ALIMENTACIÓN

Como se describió previamente, uno de los propósitos del periodo preliminar es establecer el nivel de consumo. El nivel de consumo puede influenciar significativamente la tasa de pasaje y, subsecuentemente la digestibilidad. Por lo tanto, para evitar la confusión con las mediciones de los efectos del consumo, el nivel de consumo deberá ser el mismo entre tratamientos cuando el objetivo de un experimento es comparar los coeficientes de digestión *per se*. Si se considera que el paso de la ingesta por el rumen es una función tanto de la masa ruminal como de la velocidad de flujo, y la capacidad ruminal está correlacionada positivamente con el peso corporal, los intentos para igualar los niveles de consumo deberán hacerse con relación al peso del animal. Esto es, si se utilizan consumos iguales, los tratamientos deberán proporcionarse de tal manera

que todos los animales reciban la misma cantidad relativa al peso corporal. Debido al potencial de variabilidad entre el peso corporal y la capacidad ruminal, es necesario considerar la importancia de la selección de animales con características similares (Merchen, 1993).

Para asegurarse que el nivel de consumo establecido sea consumido y para hacer de los datos tan fisiológicamente válidos como sea posible, los nutricionistas frecuentemente alimentan a los animales a niveles ligeramente menores que el consumo *ad libitum*; lo anterior ayuda a evitar la necesidad de cuantificar y analizar el alimento rechazado. Generalmente el promedio de consumo entre todos los tratamientos deberá estar basado en el tratamiento con el menor consumo. Si se utiliza un periodo de estandarización, la longitud del periodo preliminar puede ser acortada; alternativamente, si se tiene una base sólida de conocimiento previo con respecto al potencial de consumo de los alimentos a ser evaluados, un nivel de consumo por debajo del libre acceso puede ser programado arbitrariamente y usado a lo largo de los periodos preliminares y de colección (Merchen, 1993).

En experimentos largos (*i.e.*, diseños de cuadro latino), particularmente en donde existe potencial para pérdida o ganancia de peso, puede requerirse calcular los niveles de consumo basados en el peso inicial corporal; una posible excepción sería en la cual los animales son reequilibrados a una dieta estándar después de cada periodo de colección (Montgomery, 1991; Church, 1993).

La frecuencia de alimentación es un punto adicional a ser considerado cuando se conduce un experimento de digestibilidad; si bien, el alimento *ad libitum* permite el consumo de varias tomas (comidas) a lo largo del día, a pocos animales se les ofrece alimento más de dos o tres veces al día durante condiciones de producción. Por esta razón y para ahorrar trabajo (asumiendo que no existan alimentadores automáticos), muchos nutricionistas ofrecen alimento una o bien dos veces al día durante un experimento de digestibilidad. A pesar del

intervalo de alimentación elegido, éste deberá ser el mismo en todos los tratamientos y a través del experimento. Se sugiere que cuando a los animales se les alimente más de una vez al día, los intervalos entre las tomas deberán estar proporcionalmente espaciados (Pond *et al.*, 2005).

COLECCIÓN DE EXCRETAS

Para determinar el pasaje total de la MS o la digestión “aparente” de la MO, es necesario medir la excreción fecal de éstas; en algunos experimentos se requiere la medición de la excreción de la orina (*i. e.*, determinaciones de energía metabolizable, balance de nitrógeno) o del flujo intestinal de dichos componentes de la dieta (para determinar el sitio de digestión). La colección de orina se puede obtener fácilmente, tanto en corrales metabólicos o con dispositivos de colección puestos en el animal. Las medidas del sitio de digestión involucran el uso de animales fistulados intestinalmente y varios marcadores microbianos y de flujo (McDonald *et al.*, 1995).

Para la medición de la cantidad fecal se puede realizar la colección tanto de forma física y pesar la excreción fecal total, o puede ser estimada a través del uso de marcadores inertes. En forma alternativa, la digestión total en el tubo digestivo puede ser determinada directamente a través de marcadores internos en situaciones en las cuales el consumo no es medido directamente (*i. e.*, con animales en pastoreo; Perry *et al.*, 2002).

La colección fecal total de heces puede ser lograda exitosamente con corrales metabólicos o con bolsas colectoras; cuando son utilizados los primeros, las heces pueden ser pesadas y muestreadas una o más veces al día; determinándose que cuando éstas permanecen a temperatura ambiente por 7 o 24 h, no se han observado cambios significativos en la composición química o en el calor de combustión, por lo cual, si el material permanece a temperatura ambiente hasta por un día parece ser que no afecta los resultados de los experimentos de digestibilidad (Galyean, 1997).

Cuando son utilizadas bolsas colectoras, es deseable vaciar éstas al menos una vez al día cuando se utilizan en ovinos y en ganado pequeño, pero varias veces al día en ganado de talla grande; la utilización de al menos dos bolsas por animal facilita el procedimiento. Después de pesar las heces, éstas deben ser submuestreadas para los análisis químicos subsecuentes. Dichas submuestras se pueden obtener a través de retener un porcentaje fijo de la excreción fecal de cada animal; el porcentaje dependerá de la cantidad de heces excretadas y del tamaño de la muestra requerida para análisis químicos. La cantidad de muestra requerida puede variar desde una colección completa en ovinos y caprinos, hasta un 5 % del total en bovinos. Otra forma de tomar la submuestra es a través de la colección de una cantidad fija de heces de cada animal diariamente; por lo cual ésta será expresada como un porcentaje del total durante el periodo de colección (Grovmum, 1993).

CONCLUSIONES

En los sistemas de producción de rumiantes existe una gran demanda por forrajes de buena calidad, siendo los principales criterios en la calidad del mismo, el contenido de fibra y su digestibilidad. Los forrajes fibrosos de baja calidad resultan en posibles limitantes para una producción óptima (leche o carne). La calidad del forraje se estima primeramente por el consumo voluntario y la digestibilidad de la fibra; resultando que a menor calidad del forraje, menor será la digestibilidad y el consumo voluntario, lo cual indica que la calidad del forraje se describe en términos de producción de leche o carne. Existen diferentes maneras de determinar la digestibilidad de un forraje u otro tipo de alimento, entre ellas destaca las técnicas *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. El método *in vivo* es el que se utiliza tradicionalmente, ya que proporciona los datos más “reales” utilizando animales y su proceso digestivo completo. No obstante, se deben considerar los costos ocasionados por la alimentación de los animales, la mano de obra y la cantidad de tiempo invertido en dicha prueba.

REFERENCIAS

- Cheeke, P. R. (2004). *Applied Animal Nutrition, Feeds and Feeding*. Third Edition. Prentice Hall. New Jersey.
- Church, D. C. (1993). *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*. Second Edition. Prentice Hall. New Jersey.
- Galyean, M. (1997). *Techniques and Procedures in Animal Nutrition Research*. Texas Tech University.
- Grovum, W. L. (1993). "Appetite, palatability and control of feed intake". In: *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrient Metabolism*. Ed. D. C. Church. Second Edition. Prentice Hall. New Jersey.
- Jurgens, M. H. (2001). *Animal Feeding and Nutrition*. Ninth Edition. Kendall / Hunt Publishing Company.
- Kellems, R. O. y D. C. Church. (2001). *Livestock Feeds and Feeding*. Fifth Edition. Prentice Hall. New Jersey.
- McDonald, P., R. A. Edwards y J. F. D. Greenhalgh. (1995). *Animal Nutrition*. Fifth Edition. Longman Scientific and Technical, London.
- Merchen, N. R. (1993). "Digestion, absorption and excretion in ruminants". In: *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrient Metabolism*. Ed. D. C. Church. Second Edition. Prentice Hall. New Jersey.
- Mertens, D. R., y L. O. Ely. (1982). "Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization – dynamic model evaluation". *J. Anim. Sci.* 54: 895.
- Montgomery, D. C. (1991). *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana. México, D. F.
- National Research Council (NRC). (2000). *Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Beef Cattle*. Seventh Revised Edition National Academy Press. Washington, D. C.
- National Research Council (NRC). (2001). *Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. Seventh Revised Edition National Academy Press. Washington, D. C.
- Perry, T. W., A. E. Cullison y R. S. Lowrey. (2002). *Feeds & Feeding*. Sixth Edition. Prentice Hall. New Jersey.
- Peters, R. R., L. T. Chapin R. S. Emery, y H. A. Tucker. (1980). "Growth and hormonal response of heifers to various photoperiods". *J. Anim. Sci.* 51:1148-1153.
- Pond, W. G., D. C. Church, K. Pond, y P. A. Schoknecht. (2005). *Basic Animal Nutrition and Feeding*, Fifth Edition. Wiley.
- Südekum, K. H., H. Röh, M. Brandt, G. Rave, y M. Stangassinger. (1995). "Comparative digestion in cattle and sheep fed wheat silage diets at low and high intakes". *J. Dairy Sci.* 78: 1498-1511.
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Second Edition. O and B Books. Corvallis, Oregon.

Implementación de una nueva tecnología para minimizar la contaminación del aire derivada de hornos ladrilleros

Corral-Avitia A. Y,¹ Bruce, C.,² Jiménez, R.,³ Lara, A. S.,² Márquez, R.O.³

RESUMEN

Los ladrilleros, en general, utilizan combustibles de baja calidad para fabricar ladrillos, como aserrín, desechos de madera, aceite usado, desechos de plástico y llantas. Los contaminantes producidos durante el proceso de combustión incluyen partículas, compuestos orgánicos, monóxido de carbono y nitrógeno. En un esfuerzo por reducir estas emisiones, se diseñó una nueva tecnología para combatir la contaminación generada por las ladrilleras. El sistema de hornos ecológicos MK consiste en cubrir con un domo dos hornos construidos idénticamente, dirigiendo las emisiones del horno activo hacia el otro, el cual está lleno a la misma capacidad con material crudo y sirve como filtro. Los hornos están interconectados subterráneamente por canales hechos de ladrillo. El rol de los hornos cambia al volver a cargar de material crudo el horno activo. Los objetivos presentados en este trabajo resumen los esfuerzos realizados para la difusión y desarrollo del sistema de hornos ecológicos MK. Este artículo presenta, primero, el entrenamiento en el uso apropiado del sistema, luego la evaluación del uso y permanencia de los hornos MK construidos en Ciudad Juárez y, por último, la medición de la eficiencia de los hornos durante el uso de combustibles alternativos. Las emisiones se reducen con el uso del sistema de hornos ecológicos MK otorgando múltiples beneficios a los ladrilleros. Sin embargo, este proyecto sigue su proceso experimental y los resultados que se obtengan fortalecerán la difusión de estos hornos en México. Sin embargo, el uso óptimo de los hornos depende de la actitud de los ladrilleros para asimilar esta nueva tecnología.

Palabras clave: Bosque, Conservación, Diversidad, Hongos, Micorriza.

INTRODUCCIÓN

La contaminación derivada de los hornos ladrilleros es un problema mundial. Existen cerca de 700 ladrilleras en operación en las ciudades fronterizas entre México y Estados Unidos. Específicamente,

las ladrilleras han sido consideradas como una de las principales fuentes de contaminación del aire en la cuenca de El Paso del Norte (Garza, 1996). El Paso, Texas (USA), Ciudad Juárez, Chihuahua (México), y Sunland Park, New Mexico (USA) son ciudades fronterizas afectadas por este problema

1 Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, Chih., México. acorral@uacj.mx
2 New Mexico State University, Las Cruces, NM. 88001 USA.,
3 Applied Sciences Laboratory, Inc. Alburquerque, NM. 88008 USA

de contaminación. En Ciudad Juárez existen alrededor de 350 ladrilleras, las cuales utilizan diferentes tipos de combustibles que generan múltiples compuestos tóxicos. En 1993, organizaciones de Estados Unidos y México iniciaron proyectos para minimizar las emisiones de las ladrilleras (American Environmental Testing, 1993; FEMAP, 1993; Staudhammer, 1994).

La fabricación de ladrillos requiere el uso de cuatro materiales principales: arena, arcilla, agua y combustible. La arena es abundante en esta área fronteriza que comprende el desierto de Chihuahua. El Río Grande provee de agua y arcilla necesarias (Márquez, 2002). Sin embargo, el mayor problema para los ladrilleros es el combustible (FEMAP, 1993). Para la cocción total de ladrillos se necesitan temperaturas aproximadas de 600 °C, para este propósito, los ladrilleros utilizan combustibles económicos como madera de desecho, aserrín, paletas de embarque y algunas veces productos de papel, macopan, triplay, durmientes, llantas de automóviles, aceite usado de motor, diesel, keroseno y gas natural (American Environmental Testing, 1993; FEMAP, 1993; Staudhammer, 1994). La alta contaminación originada por el uso de estos combustibles ha obligado al gobierno mexicano a tomar medidas estrictas prohibiendo o restringiendo su uso. Hasta antes de la devaluación del peso en 1995, la estrategia fue la de convertir todos los hornos ladrilleros al uso de gas líquido de petróleo (gas LP) o gas natural. Sin embargo, después de la devaluación, el precio del gas aumentó y los ladrilleros volvieron al uso de combustibles económicos con la concomitante generación de contaminación del aire.

El proyecto de hornos ecológicos MK (Márquez Kiln) se generó a raíz de ver ambas problemáticas, la necesidad del trabajo productivo de la quema de ladrillos y la enorme contaminación generada por esta microindustria. El proyecto inició en 1994 con sistemas prototipo propuestos por el

Dr. Robert Márquez, quien entonces era estudiante de la Universidad Estatal de Nuevo México bajo la asesoría del Dr. Antonio Lara. Los objetivos en mente fueron: 1) minimizar los riesgos de salud y dar seguridad a los ladrilleros y comunidad en general, 2) reducción de la contaminación del aire, 3) mejorar la combustión usando combustibles económicos, 4) minimizar el consumo de combustible, y 5) minimizar los costos que se involucran en los cambios de tecnología. Después de varios prototipos, con sus ventajas y desventajas, se llegó al diseño óptimo que logró satisfacer los objetivos previamente establecidos. A todos los sistemas desarrollados por Robert Márquez se les denominó con el prefijo “MK”, en honor a él, en inglés Márquez Kiln — MK — (Hornos Márquez).

El principio del sistema de hornos MK se presenta en la Figura 1. Dos hornos se llenan de ladrillos crudos, uno para la quema y el otro como filtro. El domo controla la combustión y elimina la salida de emisiones y contaminantes a la atmósfera. La chimenea del primer horno está cerrada. La chimenea del segundo horno y el canal se usan para guiar las emisiones al segundo horno antes de salir a la atmósfera. Los ladrillos del segundo horno se usan como filtro. Después de que los ladrillos en el primer horno están cocidos, se descarga. Este horno se vuelve a llenar con ladrillos crudos que ahora servirán como filtro revirtiéndose el proceso.

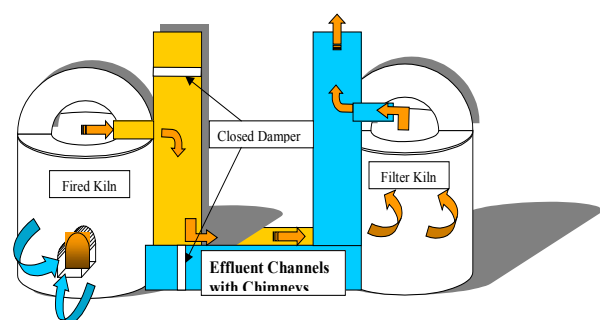


Figura 1. Principio del sistema MK. (Cortesía del Dr. Robert O. Márquez 2002).

Este horno se construyó por primera vez en Ciudad Juárez bajo el patrocinio del Programa Nacional Fronterizo de Colaboración Tecnológica (NBTPP, por sus siglas en inglés) del Departamento de Energía de Estados Unidos. La Compañía de Electricidad El Paso Electric (EPEC, por sus siglas en Inglés), al mismo tiempo, construyó este prototipo, evaluó su eficiencia y promovió su desarrollo en Ciudad Juárez. Actualmente existen 21 hornos ecológicos MK adicionales, distribuidos en diferentes sitios de la ciudad, todos patrocinados por EPEC. Una vez construidos, nace la necesidad de evaluar la aceptación, el uso y la permanencia de esta tecnología en las comunidades ladrilleras.

La Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ), en colaboración con NBTPP y EPEC está llevando a cabo el entrenamiento y la evaluación de esta nueva tecnología con el fin de poder difundir su uso. Este artículo presenta un breve resumen del avance alcanzado hasta la fecha y de la importancia del desarrollo de este nuevo tipo de tecnología en todo el país. Al mismo tiempo, se presentan los análisis cualitativos de las emisiones de estos hornos durante el uso de diferentes materiales de combustión. Se hace notar la eficiencia del uso del filtro. Los objetivos del presente estudio comprenden:

- a) Entrenamiento en el uso apropiado del sistema.
- b) Evaluación del uso y permanencia de los hornos MK construidos en Ciudad Juárez.
- c) La medición de la eficiencia de los hornos durante el uso de combustibles alternativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto está dividido de acuerdo a los objetivos que se pretenden alcanzar.

a) *Entrenamiento en el uso apropiado del sistema.* La implementación de cursos de entrenamiento teórico-prácticos fue necesaria para dar a conocer el sistema y mostrar cómo se debe trabajar en él. Este entrenamiento no sólo se impartió a los dueños de ladrilleras y ladrilleros obreros, sino también a estudiantes de la universidad y personal de las dependencias de gobierno federal y municipal. Todo esto con el fin de regular el buen financiamiento de los hornos.

b) *Evaluación del uso y permanencia de los hornos MK construidos en Ciudad Juárez.* Elaboración y distribución de formatos para el monitoreo del funcionamiento de los hornos. En estos formatos se recaba información acerca de las temperaturas dentro del horno, tiempos y número de quemas, cantidad de ladrillos acomodados en el horno y uso de horno-filtro.

c) *Medición de la eficiencia de los hornos durante el uso de combustibles alternativos.* Las emisiones de los hornos ladrilleros se midieron de manera cualitativa. La densidad de partículas emitidas por los hornos MK se midió por medio de nefelometría. Los compuestos orgánicos volátiles se capturaron utilizando trampas de adsorción VOCARB 4000, siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 2. Las muestras se llevaron al laboratorio para ser analizadas por cromatografía de gases con espectrometría de masas.

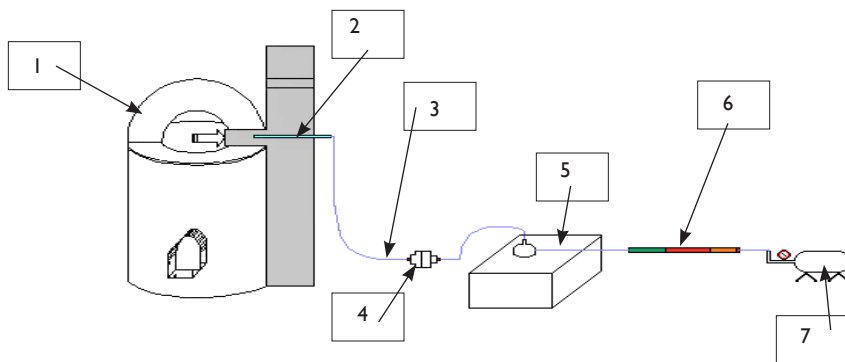


Figura 2. Representación gráfica del procedimiento de muestreo de VOC. 1. Horno. 2. Tubo de Cuarzo. 3. Tubo de Teflón. 4. Filtro. 5. Condensador. 6. Tubo de Adsorción Trampas VOCARB 4000. 7. Bomba de Aire.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Entrenamiento en el uso apropiado del sistema.

La quema de ladrillos en hornos abiertos es una actividad que se ha mantenido vigente de generación en generación. La introducción de un nuevo diseño de hornos implica un cambio en la manera tradicional de quema. La aceptación del sistema supuso el entrenamiento directo de los ladrilleros para un correcto manejo del sistema y una mejor calidad del producto. Existen 22 hornos MK en Ciudad Juárez y se ha capacitado a 19 ladrilleros en su uso. Se observó una mejor calidad de los ladrillos después del entrenamiento. Sin embargo, el uso del horno filtro resultó ser un problema que requirió la presencia de las autoridades para promover y regular su buen funcionamiento.

b) La evaluación del uso y permanencia de los hornos MK construidos en Ciudad Juárez.

Los formatos que se repartieron entre los ladrilleros se han estado colectando desde el mes de mayo del año en curso. Se ha visto una gran mejora tanto en el número de quemas como en el uso de apropiado del filtro.

c) La medición de la eficiencia de los hornos durante el uso de combustibles alternativos.

La quema de combustibles genera múltiples contaminantes. Entre ellos están contaminantes primarios “criterias”, como monóxido de carbono (CO), óxidos de azufre (SO_x), óxidos de nitrógeno (NO_x), compuestos orgánicos volátiles y contaminantes secundarios o “non-criterias”, como hidrocarburos poliaromáticos, dioxinas, furanos, ácido clorhídrico, benceno, bifenilos policlorados, arsénico, cadmio, níquel, zinc, mercurio, cromo, y vanadio (Reisman, 1997). La presencia de estos contaminantes constituye un alto riesgo de salud para la comunidad ladrillera y habitantes de los alrededores. De acuerdo con el principio MK, estos contaminantes serán retenidos por el filtro de ladrillos de los otros hornos. Este concepto se puede observar en la Figura 3, la cual nos muestra la diferencia en concentraciones de los compuestos orgánicos volátiles presentes en el horno activo (más altas) y en el horno filtro (más bajas). Este cromatograma es típico en una quema de madera en los hornos MK.

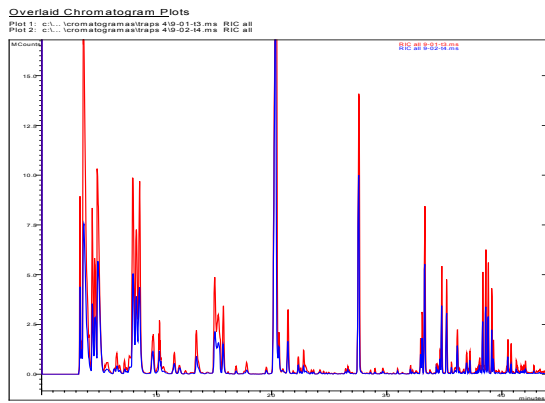


Figura 3. Caracterización de las emisiones de los hornos MK. La desadsorción de las trampas generó estos cromatogramas. Las concentraciones en el horno activo (tono gris) son más altas que aquellas en el horno filtro (tono oscuro).

La cantidad de particulado presente en las emisiones de los hornos MK disminuye de manera notoria. Experimentalmente se ha comprobado una disminución de la cantidad de partículas de 45 kg, por periodo de quema, a 4 kg.

Actualmente se están llevando a cabo estudios para determinar la eficiencia de los hornos MK en el uso de materiales alternativos. La Figura 4 muestra la gran variedad de compuestos orgánicos presentes en las emisiones de un horno tradicional durante la quema de diferentes combustibles. Se pretende probar que los hornos MK disminuyen estos contaminantes y que pueden ser utilizados como herramientas para la disminución de materiales peligrosos, como es el caso de las llantas y el aceite de motor usado. Las muestras colectadas en los hornos MK están en procesamiento.

CONCLUSIÓN

La reducción de emisiones en los hornos MK es evidente. Los beneficios concomitantes al uso de los hornos son bastante alentadores. Sin embargo, el proyecto de los hornos ecológicos MK actualmente está en proceso de experimentación, por lo tanto sería poco objetivo sacar conclusiones adelantadas acerca del funcionamiento de los hornos en las comunidades. Por el momento sólo es posible decir que el proyecto ha tenido que experimentar algunas variables que no estaban previstas

(como por ejemplo la actitud de los ladrilleros hacia una nueva forma de elaboración del producto) y que probablemente sean el factor que determine el óptimo desarrollo del proyecto.

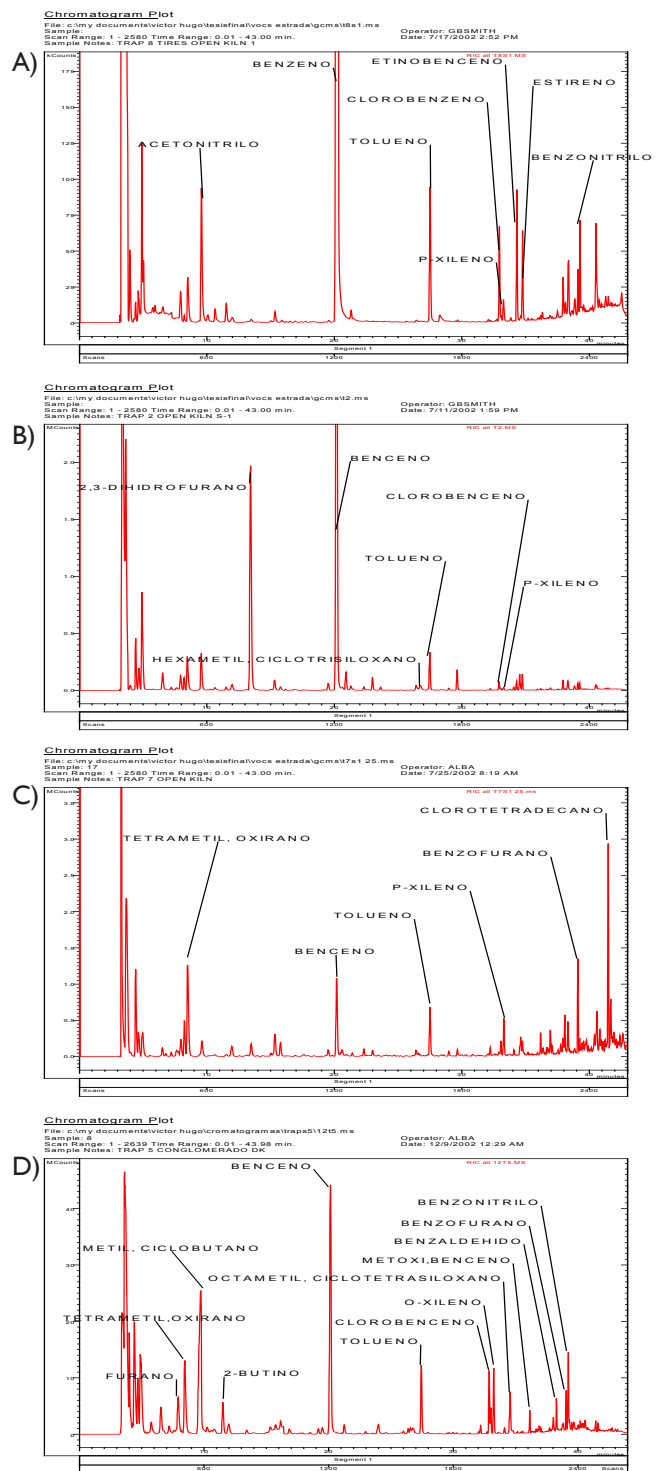


Figura 4. Cromatogramas obtenidos de la quema de a) madera, b) llantas, c) aceite y d) macopán.

BIBLIOGRAFÍA

- American Environmental Testing (1993). *Emission Testing of Ciudad Juárez, Chihuahua Brick kiln*.
- FEMAP, Federación Mexicana de Asociaciones Privadas de Salud y Desarrollo Comunitario, A.C. (1993). Ecological brick program report.
- Garza, V. (1996). *Desarrollo sustentable en la frontera México-Estados Unidos*. Estudios Regionales. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, 103 pp.
- Márquez, R. O. (2002). *Appropriate Chemistry for the Economically Limited People of the Earth*. Ph. D. Thesis. New Mexico State University, Las Cruces, NM.
- Reisman, J. I. (1997). "Air Emissions from Scrap Tire Combustion". *United States Environmental Protection Agency*. EPA/600/SR-97/115.
- Staudhammer, K. P. (1994). *Brick Characterization and Analysis Report*. LAUR-94-1321. A report for Los Alamos National Laboratory at Los Alamos, NM, 173 pp.

Nfκb y su relación en la fibrosis hepática

Elizabeth Hernández Pérez,* Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz*

RESUMEN

El factor de transcripción nuclear de κB (NFκB) se forma por la dimerización de los factores Rel. Existen 5 miembros de la familia Rel: Rel A (p65), NFκ B1 (p50), NFκB2 (p52), c-Rel y RelB. Estas diferentes combinaciones de factores Rel forman homo y heterodímeros, que se unen a un motivo de ADN (sitio κ B) NF κB es un factor de transcripción de dimerico, que juega un papel central en diversas enfermedades, entre ellas la fibrosis hepática. La fibrosis hepática se caracteriza con un incremento extraordinario de diferentes proteínas de la matriz extracelular, de manera principal de colágeno α (I). Debido a que NFκB juega un papel importante en diversos estados patológicos, se han realizado estudios para analizar los efectos terapéuticos de bloquear este factor nuclear. En este sentido, se han reportado resultados prometedores en cuanto a la reversión de la fibrosis hepática.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de respuesta a estímulos externos, es esencial para el desarrollo y sobrevivencia de todas las células de todos los organismos vivos. Una respuesta común a los estímulos que vienen del exterior celular involucra cambios en la expresión de genes por un mecanismo mediado por la activación de factores de transcripción.

El factor nuclear de transcripción κB (NFκB) es un importante regulador de diversos procesos biológicos, principalmente en eventos donde está involucrada la respuesta inmune, en reacciones de fase aguda, en el ciclo celular y en la apoptosis

entre otros. NFκB fue descrito por primera ocasión en 1986, por Baltimore como un factor nuclear necesario para la transcripción de la cadena ligera de la inmunoglobulina κ (Sen y col., 1986). Sin embargo, en la actualidad NFκB se ha descrito virtualmente todos los tipos celulares, y regula la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune (Karin y col., 2000) bajo ciertas situaciones puede actuar como una proteína anti-apoptótica, a través de la expresión de genes de sobrevivencia (Sonenschein, 1997), en desórdenes que incluyen la artritis (Foxwell y col. 2000); el asma (Barnes, 1998); la

* Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Depto. Ciencias de la Salud. México D.F.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Av. Sn Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa. C.P. 09340 Apdo Postal 55532 México D.F. Tel/Fax (52) 5 804-4730. e-mail: sila@xanum.uam.mx

respuesta inflamatoria, (Artis, 2002), diferentes tipos de cáncer (Gilmore, 1999), infecciones virales, (Arnulf, 2002; Messmer, 2002) y la fibrosis hepática (Mann, 2002) entre otras patologías. Todas estas enfermedades han sido vinculadas a una inapropiada regulación del NFκB.

MIEMBROS DE LA FAMILIA NFκB

A diferencia de la mayoría de los factores de transcripción, el NFκB esta presente en el citoplasma de la mayoría de los tipos celulares como dímero o como heterodímero de una familia de proteínas relacionadas estructuralmente.

Cada miembro de esta familia de proteínas contiene una región de 300 aminoácidos muy conservada denominada "Dominio de homología Rel" (RHD), en donde se encuentran los sitios de unión al ADN, los dominios de dimerización así como la señal de localización nuclear (NLS), la cual promueve la translocación del NFκB al núcleo (Karin, 2000).

Al momento se han descrito cinco proteínas pertenecientes a la familia de NFκB: RelA (También conocida como p65), c-Rel, Rel, NFκB1 (p50/p105) y NFκB2 (p52/p100). Los dímeros más comunes del NFκB están formados por RelA y NFκB1, sin embargo también se describe una amplia variedad de otros heterodímeros y homodímeros (Karin, 2000).

De manera independiente del tipo de dímero que conforme al NFκB en células no estimuladas se encuentra presente en el citoplasma asociado a una familia de proteínas denominadas inhibidores de κB (IκB). Los IκB se han denominado como IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ y Bcl-3. Todas las proteínas IκB contienen una región central con seis o más regiones conservadas las cuales son necesarias para su asociación con el NFκB, estas regiones son conocidas como repeticiones de ankirina; los cuales contienen 33 aminoácidos y tienen la función de mediar la interacción proteína-proteína, de manera específica la unión a NFκB en la región RHD. La región carboxi-terminal de las IκB es necesaria para la actividad inhibitoria (Schmid, 2000).

La fosforilación de IκB es iniciada por IκB quinasa (IKK), la cual es un complejo proteínico de 700-900 kDa, formado por 2 subunidades catalíticas IKKα (IKK1) e IKKβ (IKK2) y una subunidad reguladora (IKKγ (también llamado NEMO o IKKAP) (Schmid, 2000).

La fosforilación, la ubiquitinación y la degradación ocurren cuando IκBα se encuentra todavía unido a NFκB. Cuando IκB es degradado (principalmente en IκBα) la señal de localización nuclear es expuesta y los dímeros de NFκB/Rel son entonces translocados hacia el núcleo (Delhalle y col.; 2004).

FIBROSIS HEPÁTICA

La fibrosis hepática es la respuesta a un daño crónico que ocurre en la mayoría de las enfermedades inflamatorias del hígado, como la hepatitis B, la enfermedad hepática alcohólica, las enfermedades autoinmunes o metabólicas como la hemocromatosis. El resultado de este daño crónico es la acumulación de proteínas de la matriz extracelular y el reemplazamiento de la colágena tipo IV, por la colágena del tipo I, la cual es de alta densidad (Albanis, 2006).

La fibrosis hepática se caracteriza entonces por un incremento de hasta seis veces el contenido de los componentes de la matriz extracelular, así como su redistribución, entre ellos la colágena, los proteoglicanos y las glucoproteínas que lleva a cabo una alteración en la organización del hígado y en consecuencia en la función hepática. Aun cuando se considera que todos los tipos celulares del hígado (Los hepatocitos, las células endoteliales, las células de Kupffer, las células estelares) están involucrados en el desarrollo de la fibrosis hepática, se considera que las células estelares juegan un papel central en el desarrollo de esta, ya que estas células son las principales productoras de la matriz extracelular, lo cual es una característica de la fibrosis hepática y contribuye a la inflamación a través de la expresión de moléculas de adhesión, de citocinas y quimiocinas (Albanis, 2006).

En el hígado, las células estelares se encuentran en estado quiescente, y se caracterizan por almacenar vitamina A en forma de retinoides. Estas células en respuesta a una agresión sufren un proceso denominado “activación”, los diferentes tipos hepáticos contribuyen con factores que afectan a las células estelares. Durante este proceso las células van a cambiar su fenotipo y la expresión de genes, además sufren un incremento en la proliferación celular, presentan la expresión de nuevos receptores, adquieren contractibilidad y van a perder los retinoides. En este nuevo estado las células expresan actina y diferentes citocinas y factores de crecimiento. Finalmente van a adquirir un fenotipo parecido al miofibroblasto (Friedman, 2003).

NFKB/REL UN PROMOTOR DE LA FIBROGENESIS HEPÁTICA

La activación de las células estelares es asociada con una inusual y persistente activación del NFκB, sin embargo, diversos reportes indican que no es un factor clave en el proceso de la activación de estas células, ya que al inhibir la activación de NFκB, no se altera la morfología de las células estelares activadas o la expresión de genes característicos de las células estelares activadas como son: la α actina y la colagena. No obstante NFκB juega un papel importante en las células estelares activadas, ya que les confiere resistencia a la apoptosis (Lang, 2000).

Las células estelares en estado “quiescente” o no activadas carecen de NFκB/Rel nuclear, mientras que las células estelares activadas muestran NFκB nuclear, lo cual es relacionado con la expresión de genes responsivos de NFκB/Rel, como la expresión de la molécula de adhesión intracelular, IL-6 entre otros (Schmid, 2000).

Las células estelares hepáticas expresan de manera predominante el complejo clásico p65:p50, sin embargo también se puede encontrar el homodímero p65. De la misma manera se ha reportado la aparición de un tercer complejo indefinido de NFκB. Como resultado de ello las células estelares “activadas se caracterizan por la expresión de

un amplio juego de genes que no son expresados por las células estelares en estado quiescente, entre estos genes podemos mencionar la interleucina 6 (IL-6) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1)(Schmid, 2000).

NFKB Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA

La ingesta crónica de etanol conduce a un amplio espectro de cambios morfológicos y metabólicos y metabólicos en el hígado los cuales conducen a un estado patológico denominado enfermedad hepática alcohólica. Una de las principales formas de daño por la ingesta crónica de alcohol es el desarrollo de la fibrosis hepática (Thurman, 1998).

En los últimos años se ha puesto una considerable atención para poder delinear algunos de los factores involucrados en la patogénesis del daño ocasionado por la enfermedad hepática alcohólica. Una de las hipótesis es la generación de endotoxinas e intermediarios reactivos de oxígeno, los cuales incrementan la activación de NFκB en las células del hígado.

La translocación al núcleo de NFκB se ha asociado con cambios necroinflamatorios en el hígado en ratas que fueron tratadas con alcohol. La activación del factor nuclear ocurre después de la degradación proteolítica de IκB α , permitiendo la translocación de NFκB al núcleo, iniciando así la transcripción de genes (Nanji, 1999).

Los mecanismos que producen la enfermedad hepática alcohólica no han sido completamente dilucidados, sin embargo, se ha reportado que el metabolismo oxidativo del etanol provoca diferentes cambios a nivel celular y molecular. Dentro de éstos se ha mencionado daño a nivel mitocondrial estrés oxidativo y sobreproducción de citocinas inflamatorias las cuales contribuyen al desarrollo de esta enfermedad.

El acetaldehído, producto oxidativo del metabolismo de etanol juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica, de manera que se ha establecido una correlación entre

la generación del acetaldehído y el daño hepático (Liebre, 1994). Diversos reportes indican al acetaldehído como un agente pro-fibrogénico *per se*. El acetaldehído incrementa la expresión de diferentes citocinas proinflamatorias y pro-fibrogénicas.

Diversos reportes indican que estos eventos son llevados a cabo a través de la activación del NFκB en hepatocitos (Gomez Quiroz y col., 2005; Roman, 1999) así como en células estelares hepáticas en donde la activación del NFκB fue mediada por la degradación de IκBα inducida por el acetaldehído.

La relación entre la activación del factor nuclear y el daño en el hígado ha dado margen a una gran especulación, sin embargo, un mecanismo obvio por el cual se establece una relación, es que NFκB actúa como un intermediario, en el incremento de la expresión de citocinas y de quimocinas involucradas en la inflamación y la necrosis hepática (Nanji y col., 1999).

INHIBIDORES DE NFκB

Dado que NFκB juega un papel muy importante en estados patológicos, se han realizado diversos estudios para analizar los efectos benéficos de inhibir NFκB. Diversos puntos de la vía de transducción de NFκB han sido blanco de numerosos inhibidores: como la activación de IKK, la fosforilación y la degradación del IκB, la translocación nuclear de NFκB, y la actividad transcripcional.

FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS

Algunos agentes antiinflamatorios como el ácido salicílico, ejercen su efecto, al menos de forma parcial a través de la inhibición de NFκB, mediada por la inhibición competitiva del sitio de unión de ATP de la kinasa IKKβ (Yin y col., 1998).

Sulfasalazina, también ha mostrado inhibir a NFκB a través de la unión con IKK^{ββ} y bloquear actividad catalítica. También se ha reportado que algunas prostaglandinas como la prostaglandina A1 se unen de manera covalente a IKKβ (Mann, 2002).

Asimismo, algunos compuestos naturales como los flavonoides presentes en plantas, bloquean la actividad de IKK (Yang y col., 2001).

Datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la pentoxifilina, un derivado de la metilxantina protege de la degradación de IκBα y evita la translocación del NFκB al núcleo, en células estelares hepáticas de rata expuestas a acetaldehído.

INHIBICIÓN DE NFκB COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

Existen diversas estrategias para tratar a la fibrosis hepática, como el uso de agentes antiinflamatorios (corticosteroides e interleucina-10); antagonistas del factor de necrosis tumoral α (TNF-α), en el uso de agentes antioxidantes (Vitaminas E, S adenosyl metionina); agentes que bloquean las funciones efectoras de las células estelares en la fibrogénesis; el uso de antagonistas del factor de crecimiento transformante β (TGF-β); inhibidores de la proliferación celular; agentes que modulan la degradación de colágena.

Una nueva alternativa en el tratamiento de la fibrosis hepática es llevar a las células estelares hepáticas a apoptosis. La sulfasalazina es inhibida selectiva de la activación del NFκB y su mecanismo consiste en inhibir la autofosforilación de IKKα y IKKβ. Se ha reportado que sulfasalazina revierte la fibrosis inducida con tetracloruro de carbono en ratas, ya que lleva a las células estelares a apoptosis de manera selectiva (Oakley y col., 2005).

CONCLUSIONES

En los últimos años se han realizado grandes avances en cuanto a la señalización del IKK/NFκB. Diferentes patologías han sido vinculadas con una alteración en la vía de señalización del NFκB; aun cuando los resultados son promisorios, son necesarias nuevas investigaciones que corroboren estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Albanis E.; Friedman S.L.(2006). "Antifibrotic agents for liver disease". *American J. Transplant.*, 6, 12-19.
- Arnulf B., Villemain A., Nicot C., (2002). "Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses TGF β signaling in human T cells via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-1 leukemogenesis". *Blood*, 100, 4129-4138.
- Artis D., Shapira S., Mason N., Speirs K. M., Goldschmidt M., Caarmano J., Liou H. C., Hunter C.A. (2002). "Differential requirement for NF κ B family members in control of helminth infection and intestinal inflammation". *J. Immunol.*, 169, 4481-4487.
- Barnes P. J., Adcock I. M., 1998. "Transcription factors and asthma". *Eur Respr.*, 12, 221-234.
- Delhalle S., Blasius R., Dicato M. Diederich M. A., (2004). Begginner's guide to NF κ B signaling pathways. *Ann NY Acad. Sci.*, 1030, 1-13.
- Foxwell B.M., Bondenson J., Brennon F., Feldemann M., (2000). Adenoviral transgene delivery provides an approach to identifying important molecular processes in inflammation: Evidence of heterogeneity in the requirement for NF κ B in tumor necrosis factor production". *Ann Theum Dis.*, 59, 1154-9.
- Friedman S.L."Liver Fibrosis from bench to bedside". *J Hepatol.* 2003; 38 1, 538-53.
- Gilmore T.D. (1999)."Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-rel". *Oncogene* 18, 6925-37.
- Gomez-Quiroz L.E., Paris L., Lluís J.M., Bucio, L., Souza V., Hernández, E., Gutiérrez M., Santiago M., García-Ruiz C., Fernández-Checa J.C., Kershenovich D., and Gutiérrez-Ruiz M.C.,(2005)."Differential modulation of interleukin 10 in HepG2 cells treated with acetaldehyde". *LiverInter.* 25 (1), 122-130.
- Karin M., benNeriah Y.(2002). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF κ B activity". *Annu Rev Immunol.*, 1:621-663.
- Lang A., Brenner D.A., Rippe R.A. (2000)."Role of NF κ B in hepatic stellate cell activation". *J. Hepatol.*, 33, 49-58.
- Liber C.S., (1994). "Alcohol and liver". *Gastroenterology*, 106, 1085-1105.
- Lindström T., bennet P.(2005). "The role of nuclear factor kappa B in human labour". *Reproduction* 130, 569-581.
- Mann D.A., Smart D.E. (2002). "Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation". *Gut*; 50, 891-896.
- Messmer D., Bromber J., Devgan G., Jacque J.M., Granelli Piperno A., Pope M.(2002). "Human immunodeficiency virus type 1 nef mediates activation of STAT3 in immature dendritic cells AIDS" *Res Hum Retrovirus*, 18, 1043-1050.
- Nanji A. A., Jokelainen, K., Rahemtulla A., Miao L., Fogt F., Matsumoto H., Tahari S., Su G., (1999)."Activation of nuclear factor κ B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat". *Hepatology*, 30, 934-943.
- Oakley F., meso M., Iredale J.P., Green K., Marek C.J., Zhou X., may M., Miliward-Sadler H., Wrigt M.C., Mann D.A. (2005). Inhibition of I κ B kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerates recovery from liver fibrosis.
- Roman J., Colell A., Blasco C., caballera J., Pares A., Rodes J., fernandez-Checa J., (1999)."Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HepG2 cells: Effect on transcription factors AP-1 and NF κ B". *Hepatology*, 30, 1473-1480
- Schmid R. and Adler G.(2000)."NF κ B/Rel/I κ B: implications in gastrointestinal diseases". *Gastroenterology*, 118, 1208-28.
- Sen R., Baltimore D.(1986)."Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences". *Cell*, 46, 705-716.
- Sonenschein G.E.(1997)."rel/NF κ B transcription factors and the control of apoptosis". *Semin cáncer Biol.*, 8, 113-119.
- Thirman R., (1998)."Mechanism of hepatic toxicity II alcoholic liver injury involves activation of

Kupffer cells by endotoxin". Am. J. Physiol., 275, 605-611.

Yang F., Oz G., Barve S., De Villiers W.J., MacClain C.J., Varileck C.W.(2001) "The green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate blocks NF κ B activation by inhibiting I Kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6". Mol. Pharmacol., 60 3, 528-33.

Yin M.J., Yamamoto Y., Gaynor R.B. (1988). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase β . Nature, 396, 77-80.

Potencial genotóxico de aguas superficiales y sedimentos del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan y de efluentes industriales en el estado de Tlaxcala

¹Valencia-Quintana R., ²Gómez-Olivares J.L., ¹Sánchez Alarcón J., ³Castillo-Cadena J. y ⁴Waliszewski S.

RESUMEN

Los efluentes industriales, los corredores agrícolas y las aguas residuales municipales contienen sustancias desconocidas y mezclas complejas que representan un riesgo potencial para la salud de los organismos expuestos. Se evalúan marcadores de daño citogenético — como intercambios de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómica — y marcadores de proliferación celular inducidos por el agua y los sedimentos del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan, así como también por efluentes industriales, empleando como sistemas de prueba células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* y linfocitos humanos en cultivo. El origen de la genotoxicidad está relacionado con los desechos industriales y domésticos que se vierten al río.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental no es un fenómeno reciente o accidental como se ha pensado, figura entre los problemas más antiguos con que ha contado la humanidad. Este fenómeno se debe a que gran cantidad de desechos tanto líquidos como sólidos, provenientes de efluentes urbanos, industriales y agrícolas, se arrojan a los principales ríos y arroyos (McGeorge y col., 1985).

Durante años la disposición irresponsable e inadecuada de residuos peligrosos sumada a las fugas y derrames de diversas sustancias, ha ocasionado un grave problema de calidad del ambiente.

En nuestro país, hasta el momento, no se han realizado estudios globales en los que se cuantifiquen y clasifiquen los residuos industriales como contaminantes potenciales del aire, del suelo y del agua, que permitan establecer mecanismos de control y evitar problemas de salud en la población y daños al ambiente. Para solucionar este problema de contaminación se necesita en un principio del estudio y caracterización de los agentes contaminantes (Cuzcano, 2001).

¹ Facultad de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Av. Universidad No. 1, Col. La Loma X. Tlaxcala 90070, Tlax., México. prvq2004@yahoo.com.mx

² División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

³ Departamento de Genética, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

⁴ Instituto de Medicina Forense, Universidad Veracruzana.

La escasa investigación en el área ambiental arroja consecuencias importantes que incluyen la falta de legislación para el manejo de residuos peligrosos, la falta de técnicas para hacer la evaluación inicial en un sitio contaminado por estos residuos, la irresponsabilidad de los “contaminadores” y el alto costo económico que significa remediar un suelo, un cuerpo de agua y/o un flujo de agua subterránea.

CALIDAD DEL AGUA EN MÉXICO

De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua (CNA), en algunas regiones del país se puede observar un deterioro marcado en la calidad del agua, entre las más contaminadas se encuentran las cuencas de los ríos Lerma, Chapala, Santiago, San Juan, Balsas, Blanco, Pánuco, Nazas y Bravo, por lo que se ha considerado de primer orden darles atención y saneamiento (CNA, 1997).

En general, las principales fuentes de contaminación del agua se clasifican en tres grupos, de acuerdo a su procedencia:

- Sector social: corresponde a las descargas de residuos de origen doméstico y público que constituyen las aguas residuales municipales. Está relacionado con la cobertura de los servicios de agua potable y alcantarillado, se incrementa en los grandes asentamientos urbanos. La población mexicana en un 60% está concentrada en las grandes ciudades. Se calcula que el 57% de las aguas residuales se generan por la población, principalmente por las zonas localizadas en torno a las ciudades de México (23%), Monterrey (4.1%) y Guadalajara (4%).
- Sector industrial: está integrado por las descargas generadas de las actividades de extracción y transformación de recursos naturales usados como bienes de consumo y satisfactores para la población. Se calcula que la industria genera el 43% de las aguas residuales.
- Sector agropecuario: constituido por los efluen-

tes de las instalaciones dedicadas a la crianza y engorda de ganado y por las aguas de retorno de los campos agrícolas. Se calcula que la superficie agrícola de riego y temporal es de 28 millones de hectáreas, donde se usan 92,500 millones de m³ de agua y se consume el 82% de ella, por lo que la generación de aguas residuales es del 12% (11,100 millones de m³).

PROBLEMAS DE CONTAMINACIÓN POR EFLUENTES INDUSTRIALES EN CURSOS DE AGUAS

Una vez que los ríos u otros cursos de agua reciben descargas domésticas, municipales y efluentes de origen industrial, comienza el problema de contaminación o degradación de sus propiedades, es decir disminuye la calidad del agua, la hace menos útil y modifica su condición de elemento beneficioso para la salud, convirtiéndola en factor de amenaza para la misma.

EFFECTOS ADVERSOS SOBRE LA SALUD Y EL AMBIENTE

La actividad industrial ha dado como resultado la aparición en el ambiente de numerosos compuestos tóxicos, muchos de éstos han sido asociados con efectos adversos para la salud humana que incluyen profundas transformaciones celulares relacionadas no sólo con citotoxicidad, sino también con daños cromosómicos, cáncer y anomalías en la reproducción (Hemminki, 1990). En todos los casos se trata de agentes químicos que actúan dañando la molécula de ADN. Estos compuestos conocidos como genotóxicos son por lo tanto cancerígenos y teratógenos en potencia (Morettón y col., 1990).

En poblaciones que viven cerca de sitios de descarga de desechos peligrosos, se ha encontrado que la exposición a desechos industriales genotóxicos puede ser un factor que propicie una serie de enfermedades, un incremento en el cáncer gastrointestinal (Najem y col., 1985; Griffith y col., 1989), de anomalías reproductivas (Vianna y Polan, 1984; Goldman y col., 1985; Paigen y Goldman, 1987)

y de malformaciones congénitas (Goldman y col., 1985; Scarlett-Kranz y col., 1987) asimismo se ha observado un incremento, comparado con un lote control, de 13 veces más el riesgo de mutagenicidad de la orina entre empleados que manejan las plantas de tratamiento de desechos y los que manejan una variedad de desechos municipales, comerciales e industriales.

PROBLEMÁTICA DEL AGUA EN EL ESTADO DE TLAXCALA

Entre los principales problemas ambientales que presenta el territorio tlaxcalteca, está la degradación en la calidad del agua de su principal recurso hídrico, el Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan, considerado de primer orden por recibir descargas tanto urbanas como industriales.

SISTEMA HIDROLÓGICO ATOYAC-ZAHUAPAN

El río Zahuapan, principal corriente en el estado, junto con el río Atoyac forma la cuenca alta del río Balsas, que tiene un área de cuenca (aproximada) del 78% del territorio tlaxcalteca.

La cuenca del río Balsas empieza su curso en el estado de Tlaxcala y lleva por nombre río Zahuapan. Esta es la corriente principal en el estado, tiene una longitud de 82.7 Km. y un área de cuenca de 1,493.9 Km². Se origina en los escurrimientos que descienden de la vertiente sur de la Sierra de Tlaxco, casi en los límites entre los estados de Puebla y Tlaxcala, desciende desde una altitud de 3 418 msnm, 20 Km aguas abajo escurre inicialmente al suroeste, hasta la población de Atlangatepec en donde aguas arriba se construyó la presa de San José Atlangatepec hasta confluir con el Atoyac en el municipio de Xicohtzinco, Tlaxcala (INEGI 1986).

En su recorrido este río y sus afluentes sirven para irrigar más de 15,000 hectáreas de diferentes cultivos y sirven como cuerpos receptores de aguas residuales, municipales e industriales, así como medio de disposición de desechos sólidos, principalmente en las zonas de Chiautempan, Tlaxcala,

Zacatelco, Teolocholco, Xicohtzinco y Panzacola (CGE, 2003).

LA PROBLEMÁTICA DEL ATOYAC-ZAHUAPAN

El río Atoyac desde San Martín Texmelucan, Puebla y hasta la confluencia con el río Zahuapan se clasifica como un río muy contaminado, teniendo en cuenta que conduce agua residual tanto de origen municipal, como industrial que descargan directamente. Esta problemática ocasiona que el río Atoyac en dicho tramo presente (en función de la concentración de agentes químicos y biológicos) un índice de calidad del agua con promedio de 30, siendo aceptable su uso sólo en riego agrícola (forrajes), excepto hortalizas, quedando restringido en piscicultura, recreación con contacto primario y preservación de la vida acuática (CGE, 2003).

En el estado de Tlaxcala se encuentran asentadas 36 empresas, las cuales generan aproximadamente un caudal de 3,030.80 m³/día de agua residual que se descargan a la cuenca de los ríos Atoyac-Zahuapan.

La industria manufacturera es la de mayor importancia siendo las ramas textil y de confección las que concentran el 53.8% del número de establecimientos, siguen en importancia la industria de alimentos, bebidas y tabacos con el 6.4%; química 5.9%; hule y plásticos 3.9%; metal-mecánica 3.1%; papel y celulosa 1.7%; minerales no metálicos 5.6%; metal básica 4.8%; productos eléctricos 3.9%, madera 1.7%, farmacéuticos 0.3%, otras 8.9% (SECOFI, 1992).

La situación del agua de las principales fuentes hídricas del estado es preocupante, sobre todo porque no se sabe el impacto que en la salud y en el ambiente pueden producir, producen, o están produciendo los contaminantes que traen arrastrando nuestros principales ríos, ya que su utilidad para el riego agrícola no está restringido y no se sabe si representan un riesgo a largo plazo porque no se ha hecho un estudio detallado de los daños que pueden ocasionar.

ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS A NIVEL GENÉTICO

El potencial genotóxico de los desechos y efluentes industriales peligrosos puede ser establecido utilizando alguno de los más de 200 bioensayos genéticos a corto plazo que están disponibles para ayudar a la identificación de agentes que presentan un riesgo para los seres humanos, sólo unos pocos se han utilizado para este propósito. Se ha evaluado el daño cromosómico inducido por éstos en hongos plantas y cultivos de células animales (Waters y col., 1988).

El análisis toxicológico y genotoxicológico de mezclas complejas es uno de los principales focos en la investigación toxicológica actual. La evaluación de las mezclas complejas representa un problema científico formidable ya que la mayoría de la información toxicológica disponible reciente ha sido obtenida de estudios con sustancias aisladas y no es fácil transferirla a mezclas de compuestos. Aunque no existen estrategias especiales ni protocolos estandarizados disponibles para determinar efectos tóxicos o genotóxicos de mezclas complejas, los conceptos fundamentales de evaluación son los mismos para sustancias aisladas (Muller y col., 2002).

Existe un incremento del riesgo genotoxicológico en personas que viven o trabajan en áreas industriales, evidenciado por incrementos en las frecuencias de AC, ICH y alteraciones en el IR y la CPC. Los efectos de algunos factores biológicos (género, edad), estilos de vida (hábitos de fumar y beber, áreas de residencia) y época del año, deben ser considerados (Major y col. 1998).

Varios millones de toneladas de desechos industriales genotóxicos y/o carcinogénicos son liberados al ambiente cada año. La caracterización química de estos materiales de desecho puede raramente proveer de una adecuada evaluación de su genotoxicidad y de su peligro potencial. Los bioensayos no requieren información previa sobre la composición química y pueden de manera efectiva evaluar la genotoxicidad de materiales residuales complejos.

El estado de Tlaxcala no es ajeno a esta problemática, el Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan recibe efluentes domésticos, agrícolas e industriales que se descargan en cantidades cada vez mayores, lo que ha producido un incremento en la contaminación y consecuentemente de los riesgos genotóxicos potenciales sobre las plantas, los animales y el hombre mismo. Teniendo en cuenta la enorme cantidad de desechos peligrosos y el riesgo potencial sobre la población, es necesario llevar a cabo un análisis de la genotoxicidad de los desechos y de los efluentes industriales en el estado, empleando diferentes bioensayos genéticos tanto animales como vegetales.

La determinación de la mutagenicidad u otro tipo de daño producido por las muestras de agua, constituye una herramienta útil para identificar situaciones peligrosas para la salud humana, para así tomar medidas de control o prevención del riesgo. De ahí que las pruebas biológicas sean consideradas como una opción excelente en el área de monitoreo ambiental (Gumsille, 1990).

ALGUNOS ESTUDIOS REALIZADOS EN EL ESTADO DE TLAXCALA

Genotoxicidad de los sedimentos y agua del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan en las células meristemáticas de *Vicia faba* (Romano-Galicia, 1999).

Empleando como sistema de prueba las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* y como marcador de daño las alteraciones cromosómicas en anafase, así como los efectos sobre el índice mitótico (IM), se realizaron estudios con los sedimentos y agua del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan, dando un tratamiento de 4 horas con dos tiempos de recuperación (18 y 44 h). Los lugares de muestreo fueron: Panotla, Xicohtzinco-Zahuapan Presa San Lucas y Xicohtzinco-Atoyac.

Los resultados mostraron que todos los puntos analizados indujeron alteraciones cromosómicas, como aberraciones (fragmentos y puentes sencillos) y cromosomas con centrómero inactivado (CCI) tanto a las 18 h (Figura 1) como a las 44

h de recuperación (Figura 2) de igual manera las muestras analizadas fueron capaces alterar el IM de las células meristemáticas de la raíz de Vicia faba (Figura 3).

Este hecho permite considerar a los sedimentos y el agua del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan, capaces de producir daño en el material genético en este organismo y bajo las condiciones de estudio.

En Panotla, el primer punto muestreado, sólo se observan daños al centrómero sin algún efecto sobre el ADN, en el segundo punto que corresponde a Xicohtzinco presenta inducción de daño al ADN, esto quizás se deba a la acumulación de los diferentes contaminantes que son desechados por diversas industrias entre las que se encuentran fábricas de papel y tienen como desechos principales, celulosa de papel, minerales, grasas y aceites, que se suman al drenaje municipal que de alguna manera pudiera estar influyendo.

Los puntos en el Atoyac, que viene del estado de Puebla, tienen un comportamiento diferente, la presa San Lucas muestra los efectos más altos sobre el ADN así como sobre el centrómero, esto quizás se debe a la gran cantidad de mezclas provenientes de las industrias del estado de Puebla y al entrar a Tlaxcala se mezclan con descargas de las industrias maderera, automotriz, de alimentos y bebidas, de minerales no metálicos y petroquímica, que hace que se tornen más eficientes para inducir efecto clastogénico.

Al llegar a Xicohtzinco-Atoyac los efectos sobre el ADN disminuyen al igual que para los CCI, esto quizás se debe a la disminución de los contaminantes durante el trayecto.

Los resultados de este trabajo demuestran un peligro latente para los pobladores de las diferentes comunidades que se encuentran aledañas al Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan.

Los sedimentos y el agua fueron eficientes en la inducción de alteraciones cromosómicas y capaces de alterar el (IM), basado en estas observaciones, los podemos considerar como clastogénicos.

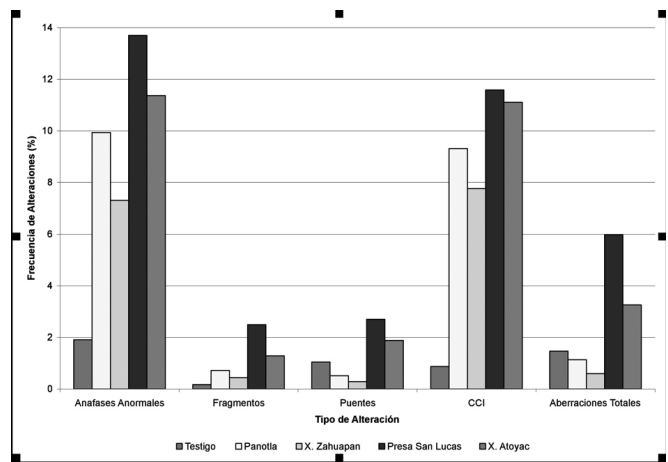


Figura 1. Frecuencia de alteraciones cromosómicas inducidas por muestras de agua y sedimentos del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan del estado de Tlaxcala en células meristemáticas de la raíz de Vicia faba, después de 4 horas de exposición con 18 horas de recuperación

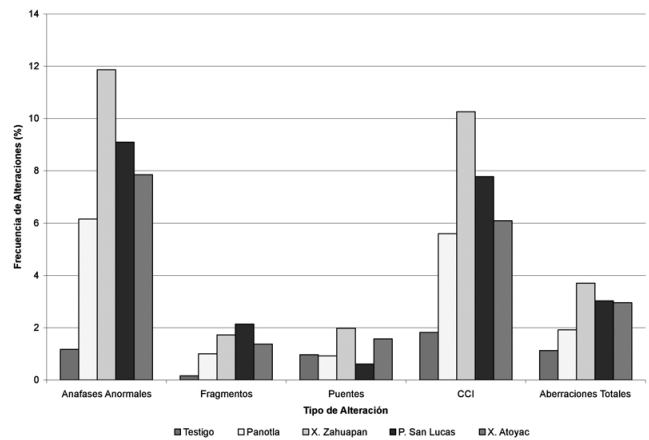


Figura 2. Frecuencia de alteraciones cromosómicas inducidas por muestras de agua y sedimentos del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan del estado de Tlaxcala en células meristemáticas de la raíz de Vicia faba, después de 4 horas de exposición con 44 horas de recuperación.

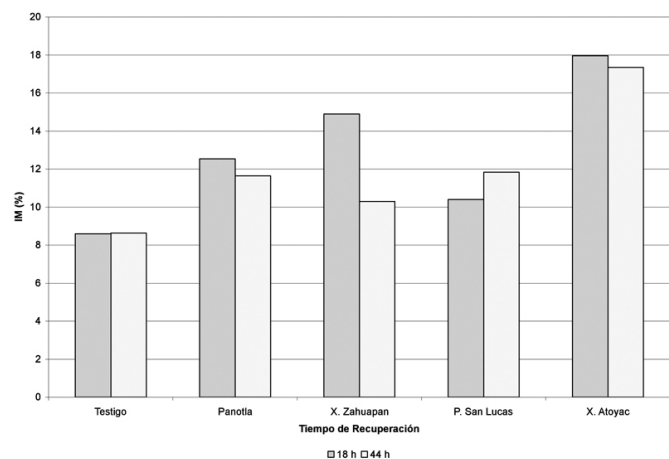


Figura 3. Efectos sobre el índice mitótico inducidos por muestras de agua y sedimentos del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan del estado de Tlaxcala en células meristemáticas de la raíz de Vicia faba, después de 4 horas de exposición con 18 y 44 horas de recuperación.

El punto con menor incidencia de alteraciones, fue Panotla y coincide con el lugar que presenta menor industrialización.

Al incrementarse el número de industrias que se encuentran en la rivera del Zahuapan, los efectos sobre el ADN y el centrómero se incrementan, el punto más crítico de esta vertiente, fue Xicohtzinco.

En el Atoyac, el primer punto muestreado fue la Presa San Lucas, es el que presenta la mayor incidencia de alteraciones tanto a nivel cromosómico como del centrómero, coincidiendo, al igual que en el caso anterior, con la existencia de un mayor número de corredores industriales, río abajo en Xicohtzinco-Atoyac los efectos disminuyen probablemente debido a la dilución de los contaminantes por la disminución de número de industrias.

MONITOREO DE LA CAPACIDAD GENOTÓXICA DEL AGUA DEL RÍO ZAHUAPAN EN XICOHTZINCO, TLAXCALA (Meneses, 1999)

Se realizó un monitoreo de las aguas del río Zahuapan en Xicohtzinco durante cuatro meses de 1997 (marzo-abril correspondientes a la época de secas así como mayo-junio representando la época de lluvias), para evaluar el riesgo genético potencial del agua del río.

La metodología propuesta para el manejo de las muestras de agua, consistió en el uso de mezclas complejas no concentradas ni fraccionadas para evitar la pérdida o alteración de alguna de las sustancias presentes en la muestra, debido a que uno de los objetivos de esta investigación era implementar una metodología simple sin incrementar los costos.

Los resultados obtenidos mostraron que los volúmenes probados (100, 250, 500, 1000), fueron incapaces de inducir efectos estadísticamente significativos sobre la frecuencia de ICH y sobre la CPC, e índice de replicación (IR), tanto en la época de secas como en época de lluvias, durante 1997 y bajo las condiciones de estudio (Figuras 4 y 5).

El municipio de Xicohtzinco forma parte del

corredor industrial Zacatelco-Xicohtzinco-Panzacola en donde se encuentran asentadas 38 industrias: 4 dedicadas al ramo de la química, 3 metal-mecánica, 3 de alimentos y bebidas, 4 al ramo de construcción, 16 textiles, 6 hules y plásticos, 1 de acumuladores para automóviles y 1 curtidora de pieles y cuero.

Durante el monitoreo en el periodo de seca y lluvias no existieron diferencias estadísticamente significativas que mostraran algún efecto de la precipitación sobre el potencial genotóxico de las muestras del río en Xicohtzinco (Figuras 4 y 5).

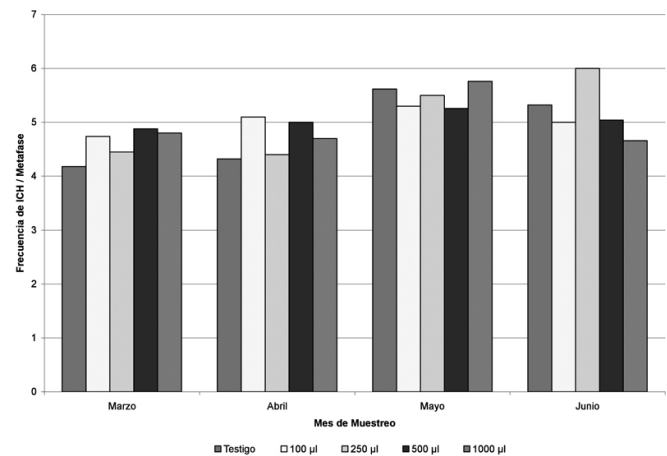


Figura 4. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por muestras de agua del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan en Xicohtzinco Tlaxcala en linfocitos humanos en cultivo de 72 h, después de 48 h de exposición.

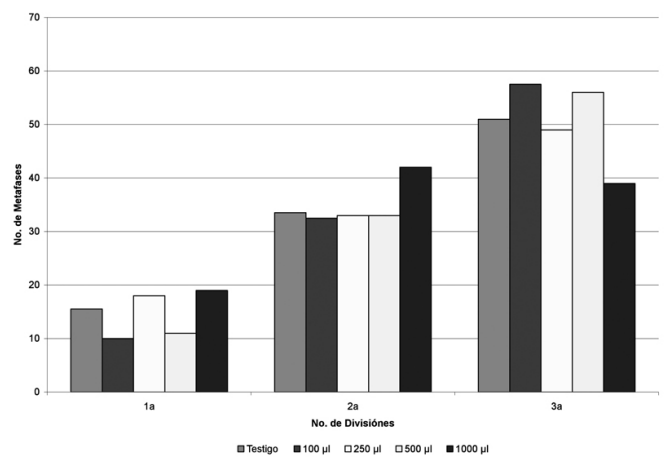


Figura 5. Efectos sobre la cinética de proliferación celular inducidos por muestras de agua del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan en Xicohtzinco Tlaxcala en linfocitos humanos en cultivo de 72 h, después de 48 h de exposición.

EFFECTOS CITOGÉNÉTICOS EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO INDUCIDOS POR LAS AGUAS DEL RÍO ZAHUAPAN EN PANOTLA TLAXCALA (Maldonado, 1999).

En este trabajo se evaluaron los efectos citogénéticos inducidos por las aguas del río Zahuapan en Panotla, Tlaxcala, mediante el análisis de la frecuencia de ICH y la evaluación de sus efectos sobre la CPC, empleando como sistema de prueba a los linfocitos humanos en cultivo. Al igual que en el estudio anterior se muestreó el lugar durante 4 meses del año.

Al aplicar las pruebas estadísticas correspondientes, encontraron que las diferencias en las frecuencias de ICH entre los grupos tratados y su testigo no fueron estadísticamente significativas, lo mismo ocurre con la CPC para los diferentes meses evaluados (Figuras 6 y 7).

Las diferencias obtenidas en ambos periodos, marzo-abril y mayo-junio, representativos de la época de secas y de lluvias respectivamente no fueron estadísticamente significativas (Figuras 6 y 7).

Evaluación del potencial genotóxico de aguas residuales: el caso de la industria textil de Santa Ana Chiautempan, Tlaxcala (Zamora y Vázquez, 2000).

En el estado de Tlaxcala y de manera especial en el municipio de Santa Ana Chiautempan, el desarro-

llo de la industria textil es notable, sin embargo, éste va acompañado de problemas ambientales como es el caso de la contaminación del agua por los efluentes que arroja al drenaje y a los cuerpos de agua, la mayoría de las veces sin tratamiento alguno.

Zamora y Vázquez analizaron muestras de aguas residuales de una industria textil a diferentes volúmenes (12.5, 25, 50, 100 y 125 μ l) utilizando como sistema de prueba linfocitos humanos en cultivo y como marcador de daño los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) así como el efecto sobre la cinética de proliferación celular (CPC) y sobre el índice mitótico.

Los resultados obtenidos demuestran la incapacidad de estos efluentes para inducir ICH, pero fueron capaces de afectar la CPC y el IM, a 125 μ l para el primero y en todos los volúmenes probados para el IM (Figuras 8-10).

Considerando lo anterior, los datos que ofrece el IM muestran que ciertamente existe un efecto letal inducido por agentes que son peligrosos aun es dosis muy bajas (Figura 10).

Los resultados negativos con respecto a genotoxicidad, en esta investigación, pueden deberse principalmente a la excesiva toxicidad de las muestras, la cual las hace incompatibles para probarse directamente en el sistema biológico.

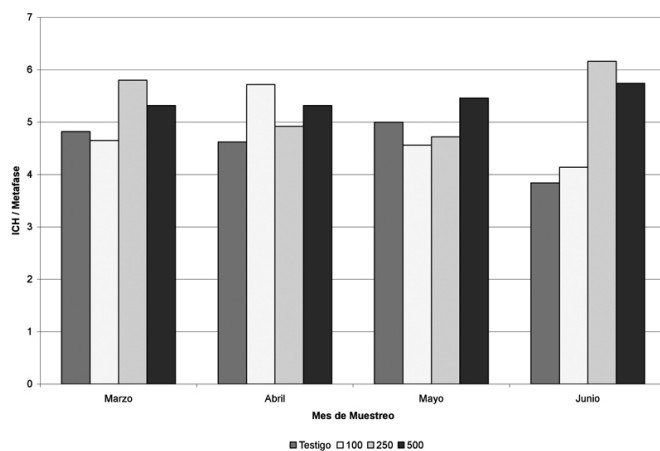


Figura 6. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por muestras de agua del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan en Panotla Tlaxcala en linfocitos humanos en cultivo de 72 h, después de 48 h de exposición.

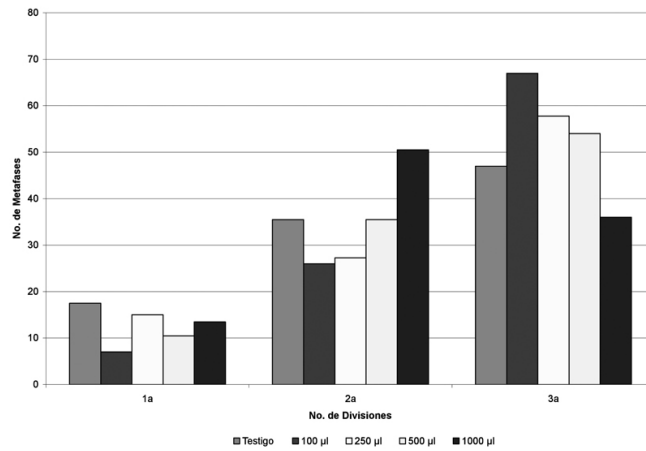


Figura 7. Efectos sobre la cinética de proliferación celular inducidos por muestras de agua del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan en Panotla Tlaxcala en linfocitos humanos en cultivo de 72 h, después de 48 h de exposición.

ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO EXPUESTOS A EFLUENTES INDUSTRIALES (SÁNCHEZ-Alarcón, 2005).

En este trabajo se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad de efluentes del corredor industrial Quetzalcóatl y de una petroquímica, localizadas en San Martín Texmelucan, Puebla y que descargan sus aguas residuales al sistema hidrológico Atoyac-Zahuapan, principal corriente en el estado de Tlaxcala

Para ello, se utilizaron como sistema de prueba los linfocitos humanos en cultivo y como marcadores de daño se analizaron los intercambios de cromátidas hermanas (ICH), la cinética de proliferación celular (CPC), el índice de replicación (IR), el índice mitótico (IM) y el índice de estimulación (IE).

En términos generales los resultados obtenidos indicaron la capacidad genotóxica de los efluentes al inducir una mayor frecuencia de ICH, en mayor cantidad para la petroquímica y en menor frecuencia para el corredor industrial Quetzalcóatl. En cuanto a toxicidad, los resultados mostraron la gran capacidad citotóxica por parte de ambas muestras así como de sus concentrados. Los efluentes de la petroquímica presentaron mayor toxicidad, un poco menor es la respuesta del corredor industrial Quetzalcóatl, pero no es nula al compararla con el testigo.

Es importante hacer un monitoreo exhaustivo de todas las industrias que contaminan el principal sistema hidrológico en el estado, para poder implementar mecanismos de control y reducción de los riesgos potenciales para la salud y el para ambiente.

CONSIDERACIONES FINALES

Los efluentes industriales, los corredores agrícolas y las aguas residuales municipales contienen sustancias desconocidas y mezclas complejas que son liberadas al ambiente y pueden llevar a la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas (Andrade, 2004).

El nivel de contaminación o calidad del agua

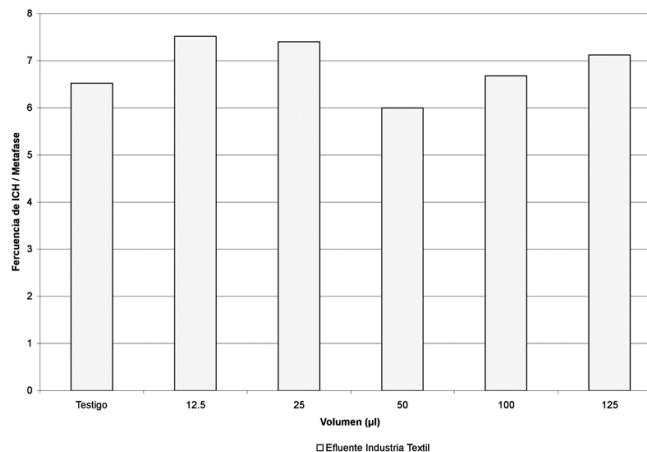


Figura 8. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por muestras de agua de una industria textil en Santa Ana Chiautempan, Tlaxcala, en linfocitos humanos en cultivo de 72 h, después de 48 h de exposición.

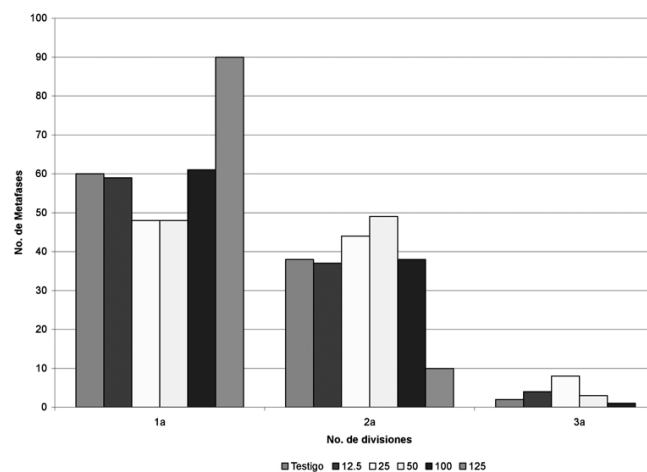


Figura 9. Efectos sobre la cinética de proliferación celular inducidos por muestras de agua de una industria textil en Santa Ana Chiautempan, Tlaxcala, en linfocitos humanos en cultivo de 72 h, después de 48 h de exposición.

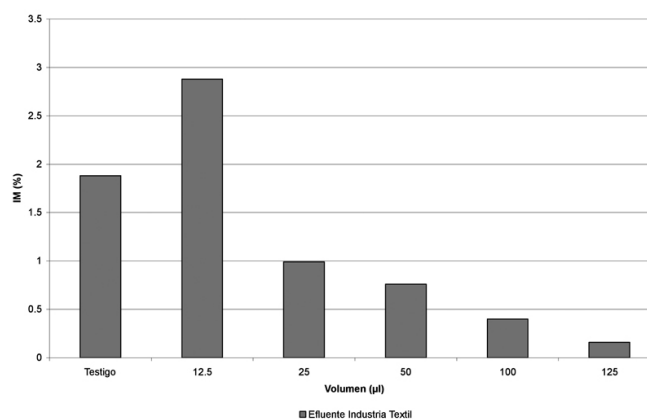


Figura 10. Efectos sobre el índice mitótico inducidos por muestras de agua de una industria textil en Santa Ana Chiautempan, Tlaxcala, en linfocitos humanos en cultivo de 72 h, después de 48 h de exposición.

superficial es determinada por análisis fisicoquímicos, saprobiológicos y radiológicos, recientemente también citogenéticos y genotóxicos. Éstos son indispensables para la evaluación de las reacciones de los organismos hacia la compleja contaminación ambiental e indican los efectos sinérgicos potenciales de varias sustancias contaminantes perjudiciales, mientras que los análisis fisicoquímicos sólo proporcionan determinaciones de la presencia y de las diferentes concentraciones en las que se encuentran.

El origen de la genotoxicidad en el agua está relacionado con los desechos industriales y domésticos, contaminación por productos agrícolas o aún por productos naturales potencialmente reactivos.

La contaminación de las aguas superficiales es un capítulo importante en el estudio de la genotoxicidad de mezclas complejas. Los ríos y lagos son los mayores reservorios de agua como una fuente de alimento, para beber/consumir, riego agrícola, propósitos de recreación y procesos industriales. Diversos estudios sobre aguas superficiales se han llevado a cabo usando diferentes propuestas para la evaluación genotóxica y han reportado contaminación de éstos por sustancias que inducen daño genético (Stahl, 1991; Houk, 1992).

En el estado de Tlaxcala, al igual que en el resto de la República, la liberación de las aguas residuales es regulada por la norma oficial NOM-001-ECOL-1996, con ella se establecen los límites máximos permisibles de contaminantes contenidos por los efluentes, con el propósito de proteger su calidad y posibilidad de uso. En esta norma sólo se determinan 8 parámetros básicos (temperatura, grasas y aceite, materia flotante, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, DBO, nitrógeno total y fósforo total) y 9 para metales pesados y cianuros (As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn y cianuro).

Las caracterizaciones químicas son el punto de apoyo en el que se basan las reglamentaciones para el manejo y disposición de los desechos y efluentes industriales. Sin embargo, estas determinaciones son limitadas en la cantidad y tipo de información

que proporcionan. La presencia de compuestos determinados es insuficiente para reflejar la gran cantidad de sustancias que integran este tipo de residuos. Ya se ha demostrado que los análisis químicos han fallado en identificar compuestos genotóxicos relevantes (Houk, 1992). Además, estos análisis no toman en cuenta los cambios en toxicidad que pueden ocurrir dentro de una mezcla debido a las interacciones químicas o a la producción de metabolitos tóxicos resultantes de varias rutas de degradación tanto químicas como biológicas.

Los efectos biológicos no pueden predecirse de manera confiable del simple conocimiento de la composición química, especialmente cuando se considera la exposición a las sustancias combinadas. Así que, las pruebas biológicas de toxicidad, en las que se expone a los seres vivos a todos los agentes biodisponibles en una muestra, destacan los efectos de los procesos de biodegradación, biotransformación, adsorción y sinergismo (Dutka y col., 1998).

Las limitaciones inherentes en los análisis químicos, comienzan a ser reconocidas por los legisladores y en las regulaciones se comienza a reflejar esta preocupación. Como consecuencia, ya se está recomendando la incorporación de métodos para evaluar la genotoxicidad junto con los análisis químicos específicos.

Aunque el impacto de los desechos genotóxicos sobre el ambiente y el significado para la salud humana son difíciles de predecir, con los estudios presentados se ha logrado la obtención de datos importantes que pueden dar pie a estudios posteriores e investigaciones que examinen la capacidad genotóxica del agua del río, de sus sedimentos y de los efluentes de otras ramas industriales en el estado, en un esfuerzo por definir las consecuencias a largo plazo sobre la biota que se encuentra continuamente en contacto. Por consiguiente, se debe reconocer también que la determinación de los efectos tóxicos ocasionados por las aguas residuales evaluadas en este estudio son el primer paso en el análisis de los recursos hídricos, los cuales

deben ser continuados de forma regular para lograr una mejor comprensión de los riesgos potenciales, así como el dar sustento a posibles medidas de solución que se requieren llevar a cabo.

CONCLUSIONES

Los efluentes, muestras de agua y sedimentos probados en los diferentes estudios, presentan resultados que confirman la presencia de agentes genotóxicos, así como citotóxicos.

A pesar de que los efluentes y aguas cumplen con la norma oficial, se hace necesario que de alguna manera en los estudios subsiguientes, se pueda establecer una norma para regular la emisión de sustancias genotóxicas, en los efluentes.

Está claro que las aguas, los sedimentos y los efluentes industriales examinados son tóxicos, por lo cual representan un riesgo potencial.

Con esta evaluación se logró la obtención de datos importantes que pueden dar pie a estudios posteriores, investigaciones que examinen la capacidad genotóxica de los efluentes de otras ramas industriales en el estado, en un esfuerzo por definir las consecuencias a largo plazo sobre la biota que se encuentra continuamente en contacto.

REFERENCIAS

- Andrade, V. M.; Silva, J.; Silva, F. R.; Heuser, V. D.; Dias, J. F.; Yoneama, M. L. y Freitas, T. R. 2004. "Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet Assay and micronucleus test". *Environ. Mol. Mutagen.* 44: 459-468.
- CNA 1997. *Diagnóstico de la calidad del agua del río Zahuapan*.
- CGE 2003. Coordinación General de Ecología, Gobierno del Estado de Tlaxcala. *Propuesta de saneamiento del río Atoyac en la zona limítrofe de los estados de Tlaxcala y Puebla*, 12 pp.
- Cuzcano, R. 2001. *Gestión ambiental de sitios contaminados. Evaluación inicial, evaluación de la exposición y remediación utilizando tecnologías innovadoras*. ILO-Moquegua-Perú, 80 pp.
- Dutka, B.J; Liu, D.; Jurkovic, A; McInnis, R; Lee, H.B; Onuska, F. y Rao S.S. 1998. "Observations from a six month study on the effect of biodegradation processes in sediment on the toxicity potential of targeted chemicals". *Environ. Toxicol. and Wat. Qual.* 13: 313-322.
- Goldman, L.R; Paigen, B; Magnant M.M. y Highland, J.H; 1985. "Low birth weight, prematurity, and birth defects in children living near the hazardous waste sites", *Love Canal. Haz. Waste Haz. Mat.* 2: 209-233.
- Griffith J., Duncan R. C., Riggan W. B. y Pellom A. C. 1989. "Cancer mortality in U. S. countries with hazardous waste sites and ground water pollution". *Arch. Environ. Health.* 44: 69-74.
- Gumsille G. F. (1990) "Carcinogénesis". Eds. Programa de Salud Ambiental, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. México, pp. 33-49
- Hemminki K. 1990. "Environmental carcinogens". En: C. S. Cooper y P. L. Crover (Eds.). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Verlag. Berlín-Heidelberg, pp. 36-61
- Houk V. S. 1992. "The genotoxicity of industrial wastes and effluents". *Mutat. Res.* 277: 91-138.
- INEGI 1986. *Síntesis Geográfica de Tlaxcala*, pp. 8-9.
- Major J., Jakab M. G. y Tompa A. 1998. *Genotoxicological monitoring of 175 subjects living in the green belts, inner town or near chemical industrial estates in Greater Budapest agglomeration*, Hungary. *Mutat. Res.* 412: 9-16.
- Maldonado M. I. 1999. *Efectos citogenéticos en linfocitos humanos en cultivo inducidos por las aguas del río Zahuapan en Panotla, Tlaxcala*. Tesis Licenciatura, Departamento de Agrobiología, Licenciatura en Biología Agropecuaria, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México, 60 pp.
- McGeorge L. J., Louis J. B., Atherholt T. B. y McGarrity 1985. "Mutagenicity analyses of industrial effluents and considerations for integration into water pollution control programs". En: M.

- D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss y S. Nesnow (Eds.) *Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures*, IV, Plenum Press, Nueva York, pp. 247-268.
- Meneses M. 1999. *Monitoreo de la capacidad genotóxica del agua del río Zahuapan en Xicohtzinco, Tlaxcala*. Tesis Licenciatura. Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 67 pp.
- Moretton J., Baró P., Zelazny A., Nuccetelli M. y D'Aquino M. 1990. "Estudio de genotoxicidad de las muestras de lodo de un río contaminado por efluentes industriales". *Rev. Int. Contam. Ambient.* 6: 55-68.
- Muller P. Stock T. Bauer S. y Wolff I. 2002. "Genotoxicological characterisation of complex mixtures. Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons". *Mutat. Res.* 515: 99-109.
- Najem G.R., Louria D.B., Lavenhar M.A. y Fererman M. 1985. "Clusters of cancer mortality in New Jersey municipalities, with special reference to chemical toxic waste disposal sites and per capita income". *Int. Epid.* 14: 528-537.
- Paigen B. y Goldman L. R. 1987. "Lessons from Love Canal: The role of the public and the use of birth weight, growth, and indigenous wildlife to evaluate health risk". En: J. B. Andelman y D. W. Underhill (Eds.), *Health Effects from Hazardous Waste Sites*. Lewis Publishers. Chelsea MI, pp. 177-192.
- Romano-Galicia F. 1999. *Genotoxicidad de los sedimentos y agua del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan en las células meristemáticas de Vicia faba*. Tesis Licenciatura, Departamento de Agrobiología, Escuela de Biología Agropecuaria, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México, 65 pp.
- Sánchez-Alarcón J. 2005. *Análisis de la proliferación celular y frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos en cultivo expuestos a efluentes industriales*. Tesis Maestría. División de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. 170 pp.
- Scarlett-Kranz J. M., Babish J. G., Strickland D. y Lisk D. J. 1987. "Health among municipal sewage and water treatment workers". *Toxicol. Ind. Health* 3: 311-319.
- SECOFI 1992. *Dotación de Recursos Naturales del Estado de Tlaxcala*. Ed. Nacional Financiera, 24 pp.
- Stahl R. G. Jr. 1991. "The Genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters". *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 22: 94-125.
- Vianna N. J. y Polan A. K. 1984. "Incidence of low birth weight among Love Canal residents". *Science*, 226: 1217-1219.
- Waters M. D., Stack H. F., Brady A. L., Lohman P. H. M., Haroum L. y Vainio H. 1988. "Use of computerized data listings and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compounds". *Mutat. Res.* 205: 295-312
- Zamora C. E., Vázquez C. O. 2000. *Evaluación del potencial genotóxico de aguas residuales, el caso de la industria textil de Santa Ana Chiautempan, Tlaxcala*. Tesis de Licenciatura. Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 78 pp.

Proporción sexual en tres poblaciones naturales de *Drosophila Pseudoobscura* originarias de la Península de Baja California

Víctor M. Salceda¹

RESUMEN

La proporción sexual en las especies está relacionada a un mecanismo aun no completamente explicado de determinación del sexo. En *Drosophila* el sexo se determina por la proporción de cromosomas sexuales contra los autosomas, además en varias especies del género ésta proporción también está relacionada con la presencia de una inversión en el cromosoma sexual (X) que ocasiona una disminución y aún ausencia de machos en la descendencia. En el presente trabajo se analiza la proporción sexual en tres poblaciones naturales de *Drosophila pseudoobscura* originarias de la Península de Baja California. La proporción sexual se calculó según la propuesta hecha por Darwin (1871) la cual es equivalente a decir cuantos machos hay por cada 100 hembras. Las proporciones sexuales se analizaron considerando cada población en forma global, dividiendo la población en homocigotos y heterocigotos y finalmente en categorías cariotípicas, así para nuestra primera observación los resultados son: San Pedro Mártir 74.5; Las Animas 95.4 y San Ignacio 103.6 machos por cada 100 hembras. Estos resultados sugieren que en la naturaleza existen más hembras que machos cuando menos en dos de las poblaciones y además la presencia de un gradiente Norte-Sur para la característica estudiada.

INTRODUCCION

Darwin (1859), menciona que la selección tiende a igualar la proporción numérica de los sexos y que cuando ésta tendencia produce un número igual de individuos de cada sexo ésta es ventajosa para la especie, ésta condición conduce al concepto de equilibrio de Fisher (1930) en el que pone en juego el valor adaptativo que confiere este parámetro. Posteriormente el mismo Darwin (1871) en su obra "The descent of man..." le dedica una buena parte de un capítulo al problema de la proporción numé-

rica entre los sexos, donde señala la importancia que representa la preponderancia de cualquiera de los sexos, entre otras observaciones menciona que el predominio de un sexo propicia la poligamia en el sexo contrario y sobre todo señala la importancia de esta proporción en relación a la selección natural con respecto al sexo y por supuesto la ventaja para la especie.

La proporción sexual en las especies está relacionada a un mecanismo aun no por completo explicado de determinación del sexo. La mayoría

¹ Doctor en Ciencias (Biología). Especialidad Genética de poblaciones de *Drosophila*. Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Carretera México-Toluca S/N. La Marquesa, Ocoyoacac. México C.P. 52750. victor.salceda@inin.gob.mx.

de las especies, independientemente del sistema de determinación sexual que presenten, muestran una igual proporción de individuos para ambos sexos. Así, cuando el sexo está determinado por el cromosoma sexual, entonces la proporción de machos está controlada mediante la segregación cromosómica en el mecanismo de la meiosis del sexo heterogámico, usualmente en los machos. En las especies diploides la proporción sexual está principalmente determinada por el balance génico en diferentes combinaciones de los cromosomas sexuales.

En *Drosophila* el sexo se determina por la proporción de cromosomas sexuales contra los autosomas (Sturtevant, 1949), sin embargo se conocen mecanismos mediante los cuales las proporciones numéricas entre los sexos se ven alteradas, así, en varias especies de este género, como es el caso de *Drosophila pseudoobscura*, *D. persimilis* y *D. subobscura* entre otras, la proporción sexual también está relacionada con la presencia de una inversión en el cromosoma sexual (X) lo que ocasiona una disminución y aún ausencia de machos en la descendencia de hembras portadoras de ésta inversión originalmente detectada por Morgan y col. (1925) y es un aspecto ampliamente estudiado en poblaciones naturales de *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. subobscura* entre otras y así por ejemplo tenemos los trabajos de Sturtevant y Dobzhansky (1936), Dobzhansky y Epling (1944), Bryant y col. (1982) en *D. pseudoobscura* y *D. persimilis* en Estados Unidos y México; estudios similares se han reportado para *D. subobscura* por Terzic y col. (1997), Pascual y col. (2004).

Otro mecanismo que ocasiona distorsiones en la proporción sexual en *Drosophila* es el denominado deriva meiótica reportado por vez primera por Novitski (1947) en *D. affinis*, y se ha continuado estudiado el fenómeno en otras especies, una cita reciente es la de Cavasini y col. (2008) que incluye una breve lista de autores.

Un tercer tipo de estudios referentes a la distorsión de la proporción sexual en *Drosophila* y en especial en *D. melanogaster* es el iniciado por Kerr

y Kerr (1952) y continuado por Drescher (1964) y denominado efecto limitado al sexo.

Estos tres tipos de mecanismos que alteran la proporción sexual son de importancia genética, sin embargo en ésta ocasión no los abordamos con la intensidad de otros estudios y sólo nos referiremos al caso de desviaciones en cuanto a la proporción numérica de los sexos, al cual se le ha prestado poca atención. El primer reporte al respecto en *Drosophila* es el de l'Heritier y col. (1936) quienes observaron una relación de 106.8 hembras por cada 100 machos esto en *D. melanogaster*. Hay que señalar que ellos utilizan una expresión diferente a la propuesta por Darwin (1871), número de hembras por cada 100 machos; en su estudio Pascual y col. (2004) reportan para *D. subobscura* estudiando poblaciones naturales y experimentales la existencia de más machos que hembras en poblaciones naturales y más hembras que machos en las experimentales,

Con ésta información del fenómeno nos propusimos analizarlo en tres poblaciones naturales de *D. pseudoobscura* y siguiendo la expresión propuesta por Darwin, número de machos por cada 100 hembras; por considerarla de mayor originalidad y ser diferente a aquellos estudios que dependen de una u otra forma de mecanismos cromosómicos conocidos.

MATERIAL Y METODOS

Se seleccionaron tres localidades de la Península de Baja California: San Pedro Mártir y Las Animas en Baja California y Oasis de San Ignacio en Baja California Sur en donde se colectaron individuos de *D. pseudoobscura*, estos fueron capturados mediante 20-25 trampas de plástico conteniendo frutas en fermentación colocadas cada 5-6 metros a fin de cubrir la mayor área posible, una vez que las moscas empezaron a visitar las trampas se iniciaron rondas de colecta cada 15-20 minutos durante el tiempo de la colecta, normalmente de las 6 a las 10 h y de las 17 hasta oscurecer, y con la ayuda de una red entomológica las moscas se cap-

turaron, éstas fueron colocadas en grupos de 40-50 en tubos homeopáticos con alimento fresco para su transporte al laboratorio en Ensenada. Ya en el laboratorio las hembras en forma individual se cultivaron en frascos lecheros de un cuarto de litro con alimento fresco donde se les permitió la postura de huevecillos y se incubaron por 8 días al cabo de los cuales se extrajeron de cada cultivo diez larvas se determinó su cariotipo y de esta forma se conoció el genotipo de la hembra capturada en la naturaleza, el cultivo se dejó en incubación hasta la emergencia de toda la descendencia, aproximadamente 8-10 días más. Una vez emergida la progenie se hicieron los conteos respectivos tomando nota del total de individuos y cuantos de cada sexo, a partir de ellos se calcularon las proporciones sexuales presentes en cada cultivo, para ello se usó la expresión empleada por Darwin (1871): número de machos por 100 dividido entre el número de hembras, resultado que es equivalente al número de machos por cada 100 hembras y que corresponde al parámetro que en esta ocasión nos interesa analizar. Una vez concluidos los conteos y cálculos de las proporciones sexuales se hicieron las tablas correspondientes. Los resultados se distribuyeron en tres categorías: en forma global por población, por individuos cuya madre era homocigota o heterocigota y por genotipo materno a fin de realizar las comparaciones pertinentes mediante una prueba de X^2 . El alimento empleado fue el de uso común en el laboratorio a base de agar, harina de maíz, azúcar, levadura de cerveza al que se le agrega ácido propiónico y tegosept como conservador y fungicida, los cultivos se mantuvieron a temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ y humedad relativa de 65 %.

RESULTADOS

La descendencia de 255 hembras de *D. pseudoobscura* capturadas en la naturaleza fue contabilizada para determinar la proporción sexual (PS) presente en las tres poblaciones analizadas; aunque la muestra fue mayor sólo se consideraron aquellas hembras que dejaron como mínimo 20 descendientes con el

fin de no tener desviaciones debidas al tamaño de muestra. La progenie se catalogó en forma global, según el genotipo materno y dependiendo si la madre era homocigota o heterocigota, lo que nos da tres opciones de comparación. Las 255 hembras produjeron un total de 10506 descendientes de los cuales 5741 fueron hembras y 4763 machos. Con la información de las tres categorías en que se agruparon los datos se elaboraron las Tablas 1, 2 y 3 que muestran los resultados obtenidos, mismos que se compararon intra e interpoblacionalmente. Los datos de las poblaciones reflejan el comportamiento del parámetro estudiado en forma global para las dos categorías cigóticas y dependiendo de la localidad en diferentes categorías genotípicas: siete para San Pedro Mártir, seis para Las Animas y nueve para San Ignacio. La proporción sexual en forma global nos dio como resultado 83 machos por cada 100 hembras, valor que varió para cada población y según se considere cada categoría. Los valores de la PS fueron para San Pedro 74.5, Las Animas 95.4 y San Ignacio 103.6 machos por cada 100 hembras, según se observa en la Tabla 1.

Cuando se analiza la cigosidad, los homocigotos presentaron una PS total de 82.5 machos por cada 100 hembras, sin embargo ésta proporción varió para cada población, así en San Pedro fue de 72.7, en Las Animas 88.2 y en San Ignacio 112.6 machos por cada 100 hembras; en tanto que este valor para los heterocigotos fué de 83.4 como promedio y los valores individuales de 76.1 para San Pedro, 114.3 para Las Animas y 95.2 para San Ignacio como se presenta en la Tabla 2.

Cuando se toma en consideración el genotipo materno la situación es un poco diferente y complicada debido a la presencia en las poblaciones de un número variable de genotipos desde seis para Las Animas hasta nueve en San Ignacio y un número intermedio, siete, en San Pedro. Los valores a este respecto se presentan en la Tabla 3 en la que se observa que el valor PS varía desde 66.7 hasta 120.1 machos por cada 100 hembras con un valor global de 82.8 machos por cada 100 hembras, hay

Tabla 1.- Proporción sexual (PS) en tres poblaciones naturales de *Drosophila pseudoobscura*.

	# hembras	# machos	PS	n
San Pedro	3752	2795	74.5	140
Las Animas	1134	1082	95.4	64
San Ignacio	855	886	103.6	51
Total	5741	4763	83.0	255

Tabla 2.- Proporción sexual (PS) en tres poblaciones naturales de *Drosophila pseudoobscura*, cuando la madre es homocigota o heterocigota.

MADRE HOMOCIGOTA

	# hembras	# machos	PS	n
San Pedro	1746	1270	72.7	66
Las Animas	820	723	88.2	45
San Ignacio	414	466	112.6	25
Total	2980	2459	82.5	136

MADRE HETEROCIGOTA

	# hembras	# machos	PS	n
San Pedro	2006	1525	76.1	74
Las Animas	314	359	114.3	19
San Ignacio	441	420	95.2	26
Total	2761	2304	83.4	119

Tabla 3.- Proporción sexual (PS) en tres poblaciones naturales de *Drosophila pseudoobscura*, según el genotipo materno.

	# hembras	# machos	PS	n
ST/ST	2646	2146	81.1	118
AR/AR	225	174	77.3	11
SC/SC	109	131	120.1	7
ST/SC	854	826	96.7	41
ST/AR	882	634	71.9	36
ST/OL	28	19	67.8	2
ST/CH	52	52	100	3
ST/CU	48	57	118.7	3
SC/AR	15	10	66.7	1
AR/CH	284	196	69	12
Sin arreglo	598	510	85.3	21

que hacer notar que estos valores fluctúan según la población.

Las desviaciones mayores en ambos sentidos, a partir del valor total, pueden ser debidas al reducido número de madres analizadas con esos genotipos, lo cual aparentemente se refleja en diferencias mayores.

DISCUSIÓN

Se presentaron los resultados de los conteos referentes a la proporción sexual en tres poblaciones de *D. pseudoobscura* arreglados según tres maneras de interpretación, la primera y más sencilla consistió en analizar la información en forma global, de

lo que se desprende que la población sureña, San Ignacio, presenta la menor desviación de la proporción ideal esperada de 1:1, ya presentó un valor de 103.6 machos por cada 100 hembras y en este caso favoreciendo al sexo masculino, y así en cuanto nos movemos al Norte las desviaciones se acentúan pero en forma inversa es decir favoreciendo al sexo femenino el cual es más abundante en las dos poblaciones restantes, notándose en general un gradiente Norte-Sur y mostrando en promedio un valor de 83 machos por cada 100 hembras lo que favorece al sexo femenino, esto se muestra claramente en la Tabla 1.

Cuando nuestro interés se centra en la cigosidad materna, también en forma global, para las madres homocigotas se mantiene la misma relación con valores un poco diferentes según se observa en la parte superior de la Tabla 2, sin embargo en la parte inferior, o sea, cuando el genotipo materno es heterocigoto notamos que en la región más norteña las hembras se ven favorecidas, en la población central los machos son los favorecidos y en la población sureña nuevamente el sexo femenino es superior de todas formas el valor promedio se conserva.

La Tabla 3 en forma simplificada muestra los valores cuando la atención se centra en el genotipo materno. En ella se observa lo complicado que es el análisis pues existen factores, como el tamaño de muestra y las diferencias en composición cromosómica que impiden comparaciones claras, pues cuando desglosamos la información en tablas individuales por población, que no mostramos por no aclarar la situación y sí alargar el texto, pudimos observar las desviaciones son erráticas. Por lo que se requiere mayor información ya sea aumentando el tamaño de muestra o bien realizando experimentos apropiados.

Por lo anterior sólo podemos concluir que sí existe un gradiente Norte-Sur que conforme se desplaza al Sur favorece al sexo masculino. El estudio de otras poblaciones está en proceso.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a las Autoridades de la Facultad de Ciencias de la UABC el apoyo durante su estancia en esa Institución por financiar los viajes de colecta del material biológico. A las Autoridades del ININ por su continuo apoyo

REFERENCIAS

- Bryant, S.H., A.T. Beckenbach and G.A. Cobbs. (1982). "Sex ratio, sex composition and relative abundance in *Drosophila pseudoobscura*". *Evolution.*, 36:, 27-34.
- Cavasini, R., L.P.B. Machado and R.P. Mateus. (2008). "Sex ratio in natural populations of *Drosophila melanogaster*". *Dros. Inf. Serv.*, 91, 92-93.
- Dobzhansky, Th. And C. Epling. (1944). "Contribution to the genetics, taxonomy, and ecology of *Drosophila pseudoobscura* and its relatives". *Carnegie Inst. Wash. Publ.* 554.
- Darwin, C. (1859). "*The origin of species by means of natural selection*". UNAM. México. pp 572 (1959).
- Darwin, C. (1871). "*The descent of man, and selection in relation to sex*". Princeton New Jersey. (1981). Princeton University Press. pp. 898
- Drescher, W. (1964). "The sex limited genetic load in natural populations of *Drosophila melanogaster*". *Amer. Natur.*, 98, 167-171.
- Fisher, R.A. (1930). "*The genetical theory of natural selection*". London. Dover reprint. N.Y. pp 291. (1958)
- Kerr, W.E. and L. Kerr. (1952). "Concealed variability in the X-chromosome". *Amer. Natur.*, 96, 405-407.
- l'Heritier, Ph. And G. Teissier. (1936). "Proportion de sexes dans de population de *Drosophila* en équilibre". *Comt. Rend.*, 202 , 692-694.
- Morgan, T.H., C.B.Bridges and H.A. Sturtevant. 1925. "The genetics of *Drosophila*". *Bibliogr. Genet.*, 2, 1-262.
- Novistki, E. (1947). "Genetic analysis of an anomalous sex ratio condition in *Drosophila affinis*". *Genetics.*, 32, 526-534.
- Pascual, M., F. Mestres and L. Serra. (2004). "Sex ratio in natural and experimental populations of *Drosophila subobscura* from North America". *J. Zool. Syst. Evol. Research .*, 42 (1), 33-37.
- Sturtevant, A.H. (1949). "The Beaded Minute combination and sex determination in *Drosophila*". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 35, 311-313.
- Sturtevant, A.H. and Th. Dobzhansky. (1936). "Geographical distribution and cytology of "sex ratio" in *Drosophila pseudoobscura* and related species". *Genetics.*, 21, 473-490.
- Terzić, T., M. Anelkovic, M. Stamenkovic-Radak . (1997). "Sex-ratio in natural population of *Drosophila subobscura*". *The First Symposium of Population and Evolutionary Genetics. Tara, Serbia.*

■ ARTÍCULO DE FONDO

Uso del icp-oes para la determinación de la composición elemental en partículas en el aire de menos de 10 μm en algunas áreas de la ciudad de Chihuahua, México

Marcos Delgado R.,^{*1} Luisa Manzanares P.,² Alberto Duarte M.,³ Arturo Keer R.,⁴ Jorge Gardea-Torresdey⁵

RESUMEN

El propósito de este estudio es correlacionar las concentraciones de metales traza presentes en las partículas ambientales del aire y la distribución de la fracción másica de las mismas en la ciudad de Chihuahua, México. Las muestras fueron obtenidas mediante filtros de fibra de vidrio, y la diferenciación de los diámetros de partícula fue obtenida usando un equipo de alto volumen con impactador de cascada. Los análisis químicos fueron realizados con un equipo de plasma inductivamente acoplado con un espectrómetro de emisión óptica (ICP-OES). Las fracciones másicas de las partículas, los patrones de distribución y la correlación entre pares de metales fue obtenida para 18 metales pesados en 29 muestras. Las partículas más finas ($<0.49 \mu\text{m}$) representaron aproximadamente el 50% de la masa total y también tuvieron las más altas concentraciones de metales pesados. Se encontró una correlación entre el tamaño de partícula y la concentración de metales pesados en las partículas más finas ($<0.49 \mu\text{m}$).

INTRODUCTION

The city of Chihuahua is one of the largest cities in Mexico. With an increasing population of 700,000, environmental problems in air quality have also increased in the past two decades. The number of

automobiles in Chihuahua has gone from 150,000 in the 1980's to 268,000 in the 1990's (Informe Anual, Municipio de Chihuahua, 2001). The fact that a large percentage of these vehicles are old and obsolete only adds to the problem. In the past, steel

*1 Corresponding author. Chemistry Department and Environmental Sciences and Engineering Ph.D. Program. The University of Texas at El Paso, El Paso, Tx, U.S.A. Phone (915) 747-5595; Fax (915) 747-5748. E-mail: mdelgado2@utep.edu. Mexican Ph.D. student in environmental sciences. The University of Texas at El Paso, Chemistry Department and Environmental Sciences and Engineering Ph.D. Program. 500 W. University Av., El Paso, Tx. 79968, U.S.A.

² Mexican Ph.D. professor; combustion and atmospheric pollution expert. Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. Miguel de Cervantes 120, Complejo Industrial Chihuahua 31109, Chihuahua, Chih., México.

³ Mexican Ph.D. professor; TEM and materials expert. Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. Miguel de Cervantes 120, Complejo Industrial Chihuahua 31109, Chihuahua, Chih., México.

⁴ Mexican Ph.D. professor; combustion and atmospheric pollution expert. Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. Miguel de Cervantes 120, Complejo Industrial Chihuahua 31109, Chihuahua, Chih., México.

⁵ American. Ph.D. professor; phytoremediation and nanoparticles expert. University of Texas at El Paso, Chemistry Department and Environmental Sciences and Engineering Ph.D. Program. 500 W. University Ave., El Paso, Tx. 79968, U.S.A.

processing plants in the southern part of the city have released heavy metals into the air, soil, and water. Those reasons could be a factor why Chihuahua City is a very known area of respiratory, asthmatic, and bronchial health problems. Concentration of heavy metals such as lead could give us an indicator of risks in the public health of the city. It is very well documented that the chronic absorption of particulate Pb may cause a significant effect in non-verbal cognitive skills, perceptual-motor skills, and fine motor skills in the children (Landri-gan *et al*; 1975).

In the past decade, various efforts have been made to examine the air quality of Chihuahua City as well as the state of Chihuahua in general. However, several gaps in research have made such an examination difficult. For example, the role of some heavy metals in aerosol chemistry has not yet been established (Vanloon *et al*; 2000). The El Paso-Juárez border served as the basis for previous studies regarding particulate matter as air quality criteria. Hornedo and Tillman (1959) conducted a two-year study under a Community Air Pollution Demonstration Project grant, in concordance with the Departments of Health, Education, and Welfare, of the United States Public Health Service, in the years 1957, 1958 and 1959. Hubert (1979) conducted a study over ambient air levels of particulates, including lead, zinc, cadmium, and arsenic in El Paso, Texas. Grey (1989) reported on vehicular traffic and air pollution in El Paso and Ciudad Juárez. Espino (2000) conducted a study on the elemental composition of air particulates surrounding the border town using a high volume sampler and analyzing the air filter samples with microwave digestion and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

In the latter part of the 1990's, the Mexican government established a minimum of 10 µm particulate matter criteria (PM10). In 1999, the Air Quality Department of Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), in conjunction with the University of Texas at El Paso (UTEP),

initiated a project designed to study the air quality tendencies of trace metals in particle matter. The aims of this project were to determinate the correlation between the particle diameter and the concentration of trace metals, as well as to study the scanning of the particulate matter situation in the atmosphere of the city, it is the first systematic particulate matter study with a duration period of 5 months. In addition, it focused on different environmental air patterns (PM10, trace metal concentrations, etc.). For the sampling issues, we choose 3 sites in the city with different socio-economical and environmental characteristics: Zone 1 is a semi-urban area with unpaved streets and a middle-class level population, near to a wastewater treatment plant. The sampling process was during the winter season in 1999. Zone 2 is an area with streets in excellent conditions, high level of transporting activities, and high density of population, from high-class level. The zone 3 has streets in good conditions, surrounded of unpaved terrains, with medium density of population, mainly from middle class social level. We choose the sites in the urban area trying to cover all the sectors of the city (urban, semi-urban, and downtown) seeking the availability of security and electrical power for the sampling equipment.

The samples were collected in glass fiber filters using a high volume (hivol) sampler and a cascade impactor with aerodynamic diameter cut points of <0.49, 0.49-0.95, 0.95-1.5, 1.5-3.0, 3.0-7.2, 7.2-10 µm in order to determine diameter differentiation in three different zones of Chihuahua City. The glass fiber filters were digested in a microwave and analyzed for metal content in an optical emission spectrometer (ICP/OES). Eighteen environmental hazardous elements were observed in this study: Cu, Cd, Sn, Pb, Ni, Zn, Fe, Ti, V, Cr, Co, Al, Be, Ba, Li, Sb, As, and Se. The method of analysis included the EPA IO-3.1 and EPA IO-3.4, microwave acid digestion system, and ICP-OES elemental chemical analysis (USEPA, 1996). The sampling period was intermittently, between December 1999

and May 2000, with a total of 29 samplings. The samplings were not continuously due the weather conditions could not permit us to sampling every day (due raining and snowing days). Several references show that the contribution of certain glass fiber filters to the final heavy metal concentrations it is important, and we have to consider it in the final calculations (Wang *et al*; 1998). Blanks with non-used filters were done in the digestion and analysis process to know background concentrations. We were chosen glass fiber filters due their performance for environmental samples and low cost. Many consulted references of similar studies were used this kind of filters with excellent results.

EXPERIMENTAL AND LABORATORY WORK

Equipment

The sampling program was done with a Graseby-Andersen PM10 High Volume sampler with Graseby-Andersen Mark III cascade impactor. The duration consisted of 24 hours per sample with air suction of 1.1-1.7 m³ min⁻¹ and Whatman glass fiber filters used as a support medium. The air-flow was measured trough pressure changes in the media and conducted in triplicate. The management of filters, the procedure of sampling, and normative limits were taken from Norma Oficial Mexicana NOM-035-ECOL-1993 and NOM-025-SSA1-1993 (1993).

The samples were digested with a CEM Mars X microwave digestion system, 1200 W of nominal power, 35 minutes of digestion, and a temperature of 150°C. The acids employed were nitric acid (HNO₃) and hydrochloric acid (HCl) 1:3.

Elemental chemical analysis was done using a Perkin-Elmer Optima 4300 DV ICP-OES system with a plasma gas flow of 16 L min⁻¹, auxiliary gas flow of 0.2 L min⁻¹, and nebulizer flow of 0.65 min⁻¹. The system analyzed all elements at the

same time, with three replicates and an automatic sample pick-up system. Standards of all elements were previously prepared at the range of one, ten, twenty and one hundred parts per million (ppm).

PROCEDURE

Geographical zones were chosen according to critical points in the city, including semi-urban zones, streets with high vehicle circulation and important atmospheric emission sources (Figure 1). For all zones, hi-vol samplers were situated at least two meters over the soil and with a surrounding space of twenty meters without natural or antropogenic obstacles (trees, buildings, hills, etc.; Micallef and Coils, 1998). Glass fiber filters were conditioned in a silica gel's dessicator for 24 h before the sampling at room temperature (approximately 25°C)

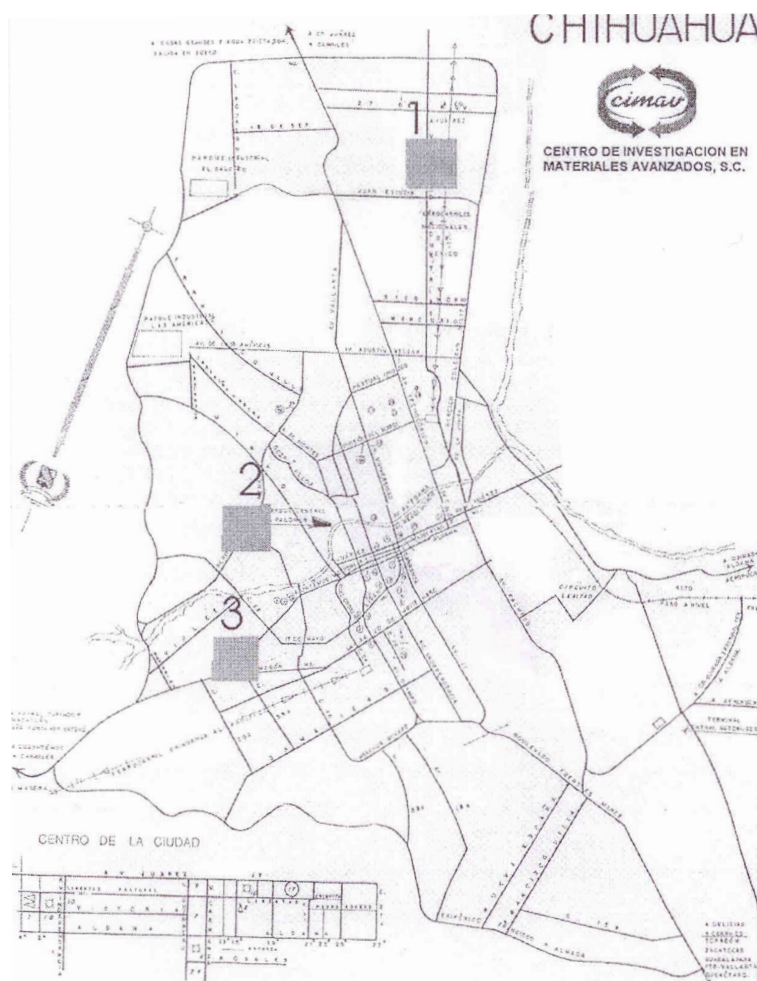


Figure 1. Map of Chihuahua City with sampling zones. The number indicates the zone of sampling.

and room relative humidity (5-10%). They were then weighed to the nearest 0.00001 g and handled with latex gloves. The hi-vol was programmed to operate for 24 h in each sampling point. Once the sampler time was complete, the filters were picked up with caution. The filters were conditioned once more for 24 h at the same conditions mentioned before and digested in the microwave system. Once digested, the samples were filtered and stored in plastic vials, ready to be analyzed by ICP-OES system.

RESULTS AND DISCUSSION

PM10 CONCENTRATIONS

A cascade impactor was used for diameter differentiation in zones 1, 2, and 3. The purpose of sampling with a cascade impactor was to obtain information regarding the distribution tendencies of particulate matter in different ranges of size. This information could be used to identify possible sources, as well as pollution health studies.

Figure 2 shows the average concentrations of particulate matter in each step of the cascade impactor during the sampling period. The smallest range of diameters (<0.49 μm) has almost 50% of the total mass of particles. Similar results were obtained for Collin *et al.* (2001) in a study with internal combustion motors. This is a very important

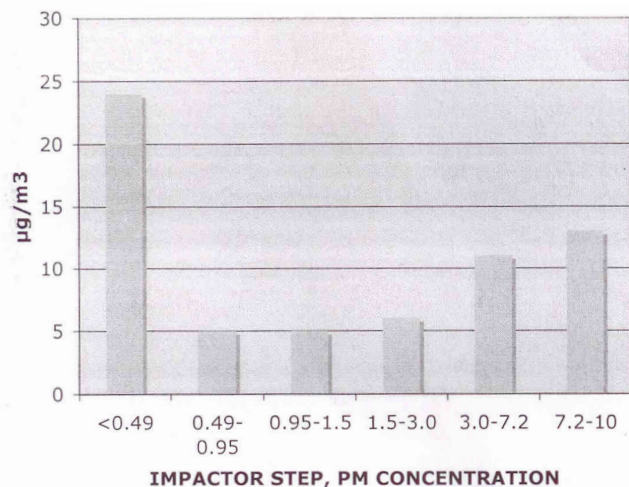


Figure 2. Particulate matter concentrations on each cascade impactor step.

issue since we can see that anthropogenic activities are essential sources of finest particulate matter. The coagulation process for aerosols in the atmosphere is approximately between 0.01 to 0.5 μm of 50% of the total mass of the finest particles coming from a coagulation process.

Figure 3 displays the concentrations of PM10 for all sampling days. The average concentration of 29 measures was approximately 51 $\mu\text{g m}^{-3}$, which is within concentration limits of annual permitted by Mexican laws (50 $\mu\text{g m}^{-3}$).

The size distribution of particulate matter for each zone was obtained by calculating the average mass fractions of all sampling points for each cut point. The distribution tendencies are shown in figures 4, 5, and 6.

In figure 4 a bimodal tendency is observed, located in the <0.49 μm and 7.2-10 μm cut point. Figures 5 and 6 showed a similar tendency, however, the second mode is not as clear as the first mode. These tendencies are similar to those reported by Espinoza *et al.* (2001) in the city of Seville, Spain.

Figures 4, 5, and 6 display the distribution tendencies where we can see that approximately 30-50% of the mass fractions of all sampled particles have a size equal to or less than 0.49 μm . This kind of particulate matter has an alveolar level penetration in respiratory system and thus accumulates in the lungs. This factor can potentially provoke chronic illnesses (NOM-025-SSA-1993; Nevers, N., 1997). This cut point has the largest trace metal concentrations, which will be re-emphasized later in the research.

The lowest concentrations of particles were found in the cut point range from 0.49-1.5 μm . This is due to the fact that the finest particulate matter has a tendency to agglomerate, forming particles larger than 5 μm . Interestingly enough, two cities such as Chihuahua and Seville, regions of very different weather, meteorology and geography, have similar mass fraction of particulate matter distribution behavior. Studies made in other cities such as Helsingki, Finland (Pakkanen *et al.*; 2001 a), and

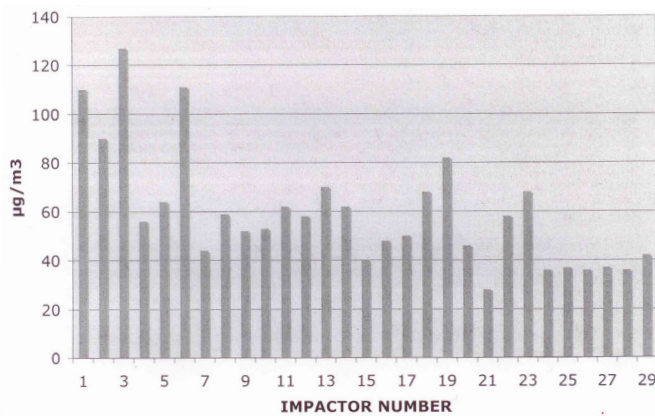


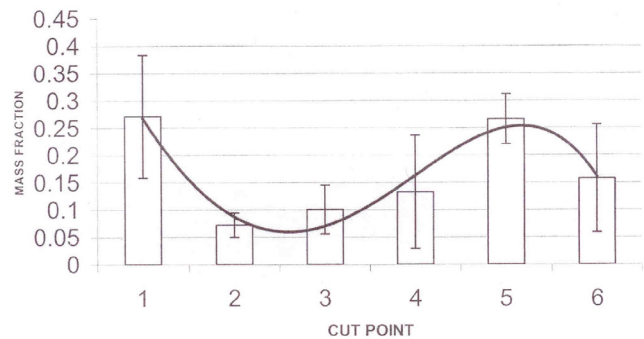
Figure 3. PM10 concentrations during sampling with diameter differentiation.

Leeds, England (Clarke *et al.*; 1999) have similar mass fraction distribution behavior as well.

TRACE METALS CONCENTRATIONS BY SIZE RANGES

Figure 7 shows the concentration plots for each trace metal in the three-diameter differentiation sampling zones. In this figure we see that the mass fraction for almost all metals is accumulated in the first cut point ($<0.49\mu\text{m}$). This shows a concordance with the distributional behavior of particulate matter (see figures 4, 5, and 6). It is possible to observe that the largest part of the trace elements analyzed (V, Cr, Cd, Cu, Pb, Fe, Be, Li, Co, and Ni) have important concentrations, mainly in the fifth cut point, seen most clearly in zone 2. The second zone has the lowest concentrations of metals as well. This zone has an atmospheric chemistry with a strong influence of motor vehicle circulation, which might explain the presence of some trace elements mentioned before. These high concentrations of heavy metals in the smallest size cut points shows similarities with other studies (Espinoza *et al.*; 2001; Pakkanen *et al.*; 2001 b). In all cut points, the mass fraction average determined was less than 0.1. The distribution of trace metals in particulate matter is very uniform in all cut points, which means that it does not display the tendencies of other particular elements.

TENDENCY DISTRIBUTION OF PM10 ZONE 1
CASCADE IMPACTOR SAMPLING



TENDENCY DISTRIBUTION OF PM10 ZONE 2
CASCADE IMPACTOR SAMPLING

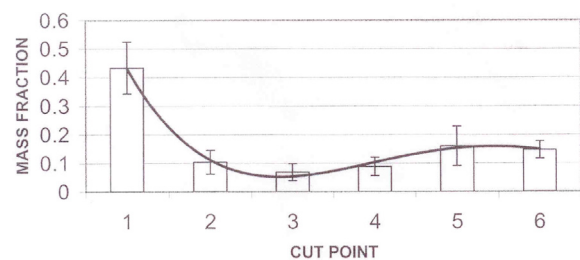


Figure 4. Mass fraction distribution of particulate matter for the different cut points for zone 1, cascade impactor sampling.

Figure 5. Mass fraction distribution of particulate matter for the different cut points for zone 2, cascade impactor sampling.

Another important issue shown in Figure 7 is the absence of aluminum in the first two zones, as well as the absence of iron in the third zone. Such an absence is significant because both metals are normally very common in soil. The mass fractions in the first cut point have values of 0.5 or more for V, Cr, Ba, Cd, Cu, Sb, Pb, Be, Co, and Ni. These values are approximately five times larger than the values found in the other cut points (with the exception of cut point 5 of zone 2).

CORRELATION BETWEEN ELEMENTS

Correlation matrixes were obtained between trace metals for each of the three zones, with or without diameter differentiation measurements. Due to the intrinsic variability in the obtained data (originated by factors such as meteorology and human activities), a correlation between metal pairs with a correlation coefficient (r^2) equal to or greater than

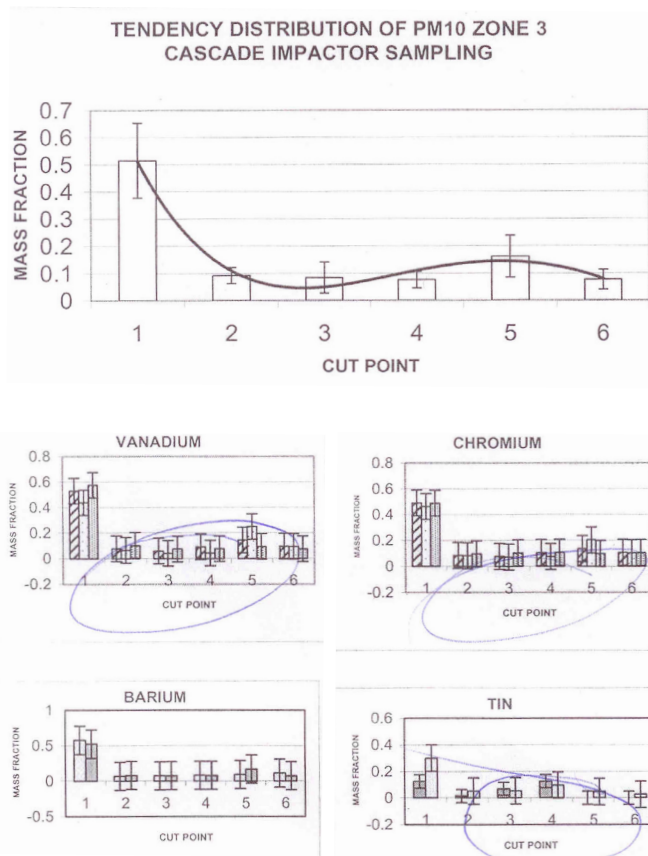


Figure 6. Mass fraction distribution of particulate matter for the different cut points for zone 3, cascade impactor sampling.

Figure 7. Mass fraction distribution of each trace metal and particulate matter cut points in the three sampling zones, diameter differentiation.

0.5 had to be considered. The number of occurrences is shown in Figure 8a and 8b.

The trace metal pairs with the highest occurrence were aluminum-barium, aluminum-iron, selenium-thallium and barium-iron. Aluminum, iron, and barium are three elements with high concentrations in normal soils (USEPA-NCEA, 1997).

The case of selenium-thallium is interesting because both of them are trace elements emitted in combustion processes and reported in similar studies (Sitzmann *et al.*; 1999; Raask, E.; 1985). The lead has important correlations with arsenic and thallium. If this tendency is maintained in other places, the health risk by lead is joined by other trace metal risks (for example, the arsenic is well known as a cause of some carcinomas in the respiratory system if it is accumulated chroni-

cally). Other metal pairs with high correlations are selenium-beryllium, zinc-aluminum, barium-zinc, nickel-thallium, arsenic-vanadium, and chrome-cooper.

CONCLUSIONS

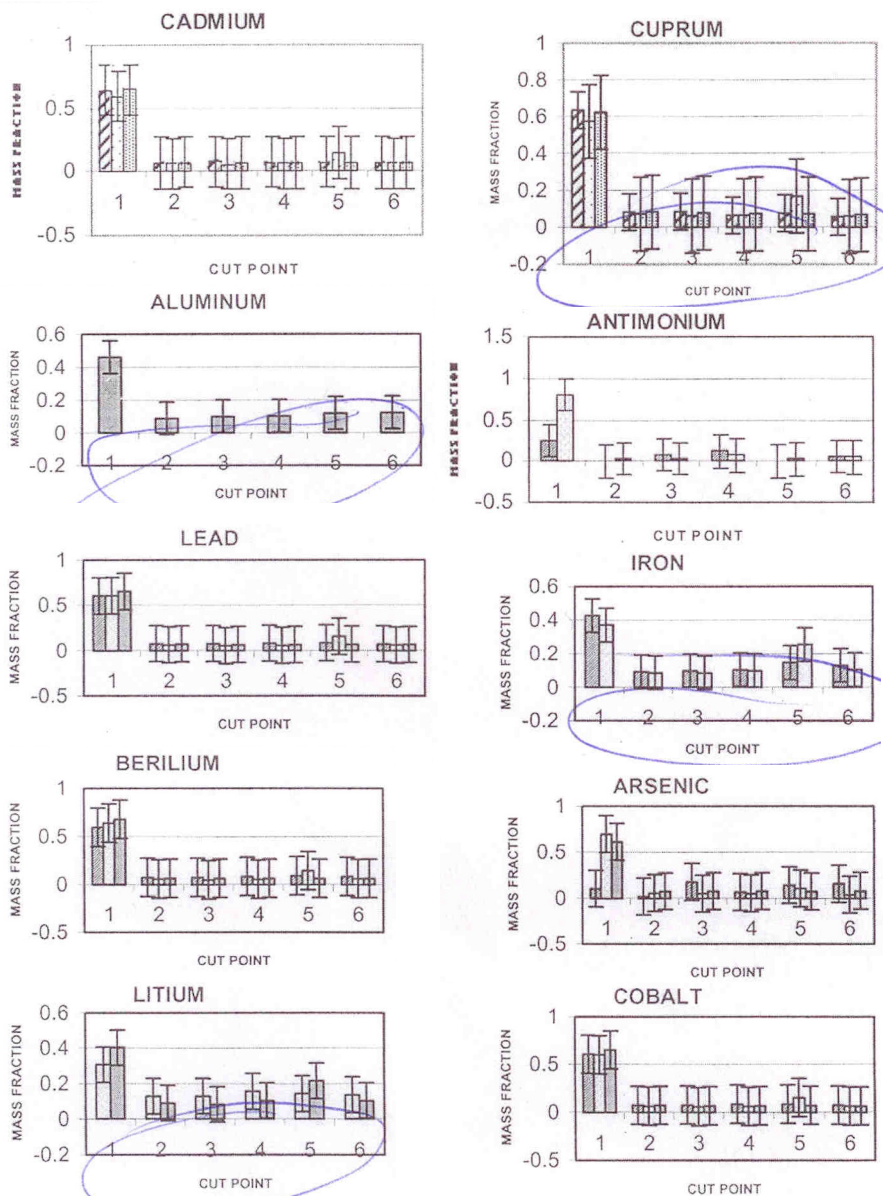
The particles lower than $0.49 \mu\text{m}$ represent approximately 50% of the total mass of particulate matter suspended in the atmosphere of Chihuahua City. This pattern is in concordance with some studies made in cities such as Seville, Helsinki, Leeds and London. This particulate matter distribution behavior could be a generalized pattern for urban areas.

The finest particles ($<0.49 \mu\text{m}$) had the highest concentrations of toxic trace elements as well as the highest proportion of mass fraction of particulate matter. These particles have longer resident times in the atmosphere, so we can expect important heavy metal concentrations to be found in Chihuahua City's atmosphere. This fact could affect the number of chronic diseases of human respiratory system.

A correlation between particulate matter size and trace metal concentrations exist for $<0.49 \mu\text{m}$ cut point, because in these step the concentration of particles and heavy metals is higher than found the concentration in the other cut points. The largest concentrations of trace metals were located in the particulate matter cut point of $<0.49 \mu\text{m}$, which has an anthropogenic origin (fuel combustion).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) in Mexico and would not have been possible without the contributions from the University of Texas at El Paso (UTEP). The opinions and conclusions expressed within this research are those of the authors and not necessarily those of the supporting organizations.



Figures 8a and 8b. Correlations between metal pairs larger than $r^2=0.5$. (JPEG Picture)

REFERENCES

Chemical Species Analysis of Filter-Collected Suspended Particulate Matter (SPM); U.S. Environmental Protection Agency Method IO-3.1
 Clarke, A.; Azadi-Boogar, G.; Andrews, G. (1999). "Particle Size and Chemical Composition of Urban Aerosols". *The Science of the Total Environment*, 235, 15-24.
 Collin, F., Gonnord, M.F., Momique, J.C., Monier, R., Walter, Ch. (2001). "Particulate Matter Size Distribution and Associated Polycyclic Aromatic

Lead, Zinc, Cadmium, and Arsenic in El Paso, Texas. The University of Texas at El Paso, Master of Science Thesis.

Landrigan, P.; Whitworth, R.; Baloh, R.; Staehling, N.; Barthel, W.; Rosenblum, B. 1975. "Neuropsychological Dysfunction in Children with Chronic Low-Level Lead Absorption". *The Lancet*, March: 1-12.
 Micallef, A., Coils, J. (1998). "Variation in Airborne Particulate Matter Concentration over the First Three Meters from Ground in a Street Can-

Hydrocarbon Content from Indirect and Direct Injection Diesel Engines". *Int. Journal of Engine Research*, 2(1), 23-33.

De Nevers, N. (1998). *Ingeniería de Control de la Contaminación del Aire*. México: McGraw-Hill. P. 211

Espino, T. (2000). *Use of Microwave Digestion and ICP-MS to Determine Elemental Composition of Air Particulates in El Paso/Juarez Airshed*. The University of Texas at El Paso, Master of Science Thesis.

Espinoza, E.; Fernández, A., Ternero, M., Barragán, F., Jiménez, J. (2001). "Size Distribution of Metals in Urban Aerosols in Seville (Spain)". *Atmospheric Environment*, 35, 2595-2601.

Grey, R. (1989). *Vehicular Traffic and Air Pollution in El Paso-Cd. Juarez*. El Paso, Tex. Texas Western Press.

Hornedo, M.; Tillman, J.H. (1959). *Air Pollution in El Paso Texas Area*. El Paso City-County Health Unit.

Hubert, J.S. (1979). *Ambient Air Levels of Particulates,*

- yon: Implications for Human Exposure". *Atmospheric Environment*, 32, 3795-3799.
- NOM-025-SSA1-1993; *Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto a partículas menores de 10 micras (PM10). Valor permisible para la concentración de partículas menores de 10 micras (PM10) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población*; published in *Diario Oficial de la Federación* (August 18, 1994).
- NOM-035-ECOL-1993; *que establece los métodos de medición para determinar la concentración de partículas suspendidas totales en el aire ambiente y el procedimiento para la calibración de los equipos de medición*; published in *Diario Oficial de la Federación* (October 18, 1993).
- Pakkanen, T.; Kerminen, V.; Korhonen, C.; Hiltamo, R.; Aarnio, P.; Koskentalo, T.; Maenhaut, W. (2001 a). "Use of Atmospheric Elemental Size Distributions in Estimating Aerosol Sources in the Helsinki Area". *Atmospheric Environment*, 35, 5537-5551.
- Pakkanen, T.; Kerminen, V.; Korhonen, C.; Hiltamo, R.; Aarnio, P.; Koskentalo, T.; Maenhaut, W. (2001 b). "Urban and Rural Ultrafine Particles in the Helsinki Area". *Atmospheric Environment*, 35, 4593-4607.
- Sitzmann, B.; Kendall, M.; Watt, J.; Williams, I. (1999). "Characterization of Airborne Particles in London by Computer-Controlled Scanning Electron Microscopy". *The Science of the Total Environment*, 241, 63-73.
- U.S. Environmental Protection Agency Method IO-3.4 (1996). *Determination of Metals in Ambient Particulate Matter Using Inductively Coupled Plasma (ICP) Spectroscopy*.
- Vanloon, Gary W.; Duffy, Stephen J. (2000). *Environmental Chemistry, a global perspective*. New York: Oxford University Press. Pp. 132-134.
- Wang, C.F.; Chin, C. J.; Chiang, P.C. (1998). "Multielement Analysis of Suspended Particulates Collected with a Beta-Gauge Monitoring System by ICP Atomic Emission Spectrometry and Mass Spectrometry". *Analytical Sciences*, 14 (4) 763-768.

Instructions to 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:
 - Short and concise title, written in both English and Spanish or Romance languages.
 - A brief abstract between 40 and 150 words, which should also be written in both languages.
 - Name and nationality of authors.
 - Affiliation of authors, including highest degree and research field of all authors.
 - 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.
 - Specify type of paper, i.e. Research article, Short manuscript or Invited Review.
 - Postal address of the corresponding author, which includes: telephone, fax and e-mail. Corresponding author should be highlighted with an asterisk (*) mark.
 - Manuscripts should be submitted in triplicate, printed in one side only, letter or A4 size paper, double-spaced, with margins of 3 cm.
 - 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.
 - 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.

- Figures and tables should be mentioned in the text, and numbered in arabic numbers. The software in which they were created, should be mentioned.
- Figure and table legends should be concise and understandable, and should be listed at the end of the manuscript (after references).
- Bibliographic references should be quoted in the text by writing the last name of the first author and publication year between parenthesis. References will be included at the end of the text, ordered alphabetically.
- In references for book titles, capital letters should be used only at the beginning of the title and on authors names.
- When using abbreviations, the full meaning of them should be provided, when mentioned for the first time.
- 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.

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 los autores

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 (artículos 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, el que 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 re-

serva 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):
 - Título del trabajo, breve y conciso en inglés y español
 - 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.
 - Nombre y nacionalidad del autor
 - Adscripción de todos los autores, incluyendo el máximo grado de estudios y área de especialización.
 - La institución de adscripción de los autores participantes deberá incluirse como un pie de página, comenzando con el número 1.
 - Ejem. 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 que sean mencionados.
 - Naturaleza del trabajo: artículo de investigación, avance de investigación, etc.
 - 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 (*).

- Presentar 3 originales impresos en una sola cara, en papel Bond tamaño carta o A4, a doble espacio y con márgenes de 3 cm.
- Adjuntar el texto con una copia del trabajo en disquete, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Las referencias bibliográficas deben asentarse de la forma convencionalmente establecida en español, es decir, indicando estas 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.
- Al citar los títulos de libro, se deben utilizar mayúsculas solo al inicio y en nombres propios.
- 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.
- Distribuir los datos de las referencias bibliográficas de la siguiente manera:

REFERENCIA DE 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 DE 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., 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.