

# **Ciencia en la frontera**

Revista de ciencia y tecnología de la UACJ



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

#### DIRECTORIO

**Felipe Fornelli Lafón**  
Rector

**Héctor Reyes Leal**  
Secretario General

**Javier Llera Pacheco**  
Director General de Investigación Científica

**Ernesto Morán García**  
Director del ICB

**Eduardo Pérez-Eguía**  
Coordinador de Investigación del ICB

#### CONSEJO EDITORIAL

Emilio Álvarez Parrilla  
Leonel Barraza Pacheco  
Alejandro Donohue Cornejo  
Esaúl Jaramillo  
Alejandro Martínez  
Francisco Molinar Holguín  
Roberto de J. Mendoza de E.  
Antonio de la Mora  
Helvia Pelayo Benavides  
Luis Fernando Plenge  
Joaquín Rodrigo García  
Laura de la Rosa  
Hugo Staines Orozco

#### DIRECTOR

Luis Fernando Plenge

#### CORRECCIÓN

Mayola Renova González

#### COMPOSICIÓN

Armando Gutiérrez Rodríguez

## 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 Fragoso Sierra

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

#### Jorge Gardea Torresdey

Chemistry, UTEP, El Paso, Texas.

#### Armando Gómez Puyou

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

#### Gustavo González

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 Alimentos,  
Universidad de Murcia, España.

#### Gaspar Ros Berrueto

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

#### Rocío Salceda Sacanelles

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

#### Fernando Soler

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

#### Marieta Tuena de Gómez Puyou

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

#### José Vázquez Tato

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

#### 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, Dirección General de Investigación Científica. Vol. III, núm. Especial (marzo 2004). Ciudad Juárez, Chih.: UACJ, 2004. v. ; 21 cm.

Seriada

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

Q4.R48 2004

505.R48 2004

#### DIBUJO DE CUBIERTA: Tomado del trabajo de David Díaz.

Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ es una publicación seriada del Instituto de Ciencias Biomédicas a través de la Dirección General de Investigación Científica de la UACJ, vol. III, núm. especial, marzo de 2004, precio por ejemplar: \$50.00 pesos en México y \$10.00 dólares al extranjero (incluye gastos de envío). 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, fax (656) 688 18 83. Hecho en México/Printed in Mexico. 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□

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.

# C O N T E N I D O

|  |          |
|--|----------|
| <b>Resúmenes/Abstracts .....</b>   | <b>5</b> |
| <b>Presentación</b>  |          |
| Alejandro Martínez .....   | 9        |
| <b>Función de las proteínas que unen nucleótidos de guanina en la fecundación</b>  |          |
| Jesús García-Soto, Guadalupe Martínez-Cadena, Fernando Covián-Nares, Salvador Manzo-Ávalos y Juana López-Godínez .....                                 | 11       |
| <b>Envejecimiento de semillas: síntomas, causas y mecanismos de protección</b>   |          |
| Irma Bernal Lugo y Adriana Camacho .....   | 17       |
| <b>El AMP cíclico modula la señal intracelular de Ca<sup>2+</sup> en linfocitos humanos</b>  |          |
| Laura A. A. de la Rosa Carrillo .....  | 21       |
| <b>Nanopartículas metálicas y semiconductoras en dispersiones coloidales. Revisión de aspectos experimentales, teóricos y potenciales aplicaciones</b> |          |
| David Díaz .....   | 27       |
| <b>Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas</b>   |          |
| Emilio Álvarez Parrilla .....  | 35       |
| <b>Perspectiva de los organismos genéticamente modificados</b>   |          |
| Mario Gaytán Alcocer .....   | 43       |
| <b>Fitorremediación de metales pesados y formación de nanopartículas usando plantas de alfalfa</b>   |          |
| Jorge L. Gardea Torresdey, Eduardo Gómez, José R. Peralta Videa, Kirk J. Tiemann, Jason G. Parsons, Horacio Troiani y Miguel José Yacamán .....        | 49       |



# C O N T E N T S

## ***Presentation***

Alejandro Martínez ..... 9

## ***The role of guanine nucleotide-binding proteins in fecundation***

Jesús García-Soto, Guadalupe Martínez-Cadena, Fernando Covián-Nares,  
Salvador Manzo-Ávalos y Juana López-Godínez ..... 11

The egg of most species contains thousands of secretory vesicles, known as cortical granules. Immediately after fertilization, these vesicles undergo a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis transforming the extracellular layer in a barrier to supernumerary sperm. During maturation of the oocyte, cortical granules translocate from the cytosol to the oocyte cortex in a microfilament-mediated process. We have studied the subcellular distribution of Rho, a GTPase of the Ras superfamily, and investigated its role on cortical granule translocation. We observed that Rho is synthesized early in oogenesis and, at the end of maturation, it localizes in the cortical granules. When Rho is inactivated by ADP-ribosylation with the C3 exotoxin, the vesicles do not translocate and the microfilaments undergo disorganization. Our observations indicate that the Rho GTPase is synthesized in the early stages of oogenesis and, when maturation initiates, it associates with the cortical granules. Likely, Rho participates in maintaining the correct organization of the microfilaments during the cortical granule movement.

## ***Seed aging: symptoms, causes and protective mechanisms***

Irma Bernal Lugo y Adriana Camacho ..... 17

The aging of stored seeds has two stages. One stage is that of relative stability characterized by a slow loss of viability and other typified by a dynamic loss of viability. Both stages are modeled in seed survival curves. The vitreous stage of cytoplasm and the enzymatic antioxidant system have been proposed as the mechanisms that avoid deleterious reactions controlling the phase of relative stability. The partial or total loss of vitreous stage as well as an increase in mitochondrial production velocity of super-oxide radical can be responsible for the fast loss of the dynamic viability. Additionally, a diminishing in the capacity of antioxidant systems to contend with oxygen radicals generated during seed germination, could also participate in the fast loss of dynamic viability. Thus, a series of oxidative reactions could provoke the loss of membrane integrity, a reduction in macromolecules synthesis and enzymatic activity, as well as chromosomal mutation accumulation that characterizes the aging of stored seeds.

### ***Cyclic AMP modulates calcium signaling in human lymphocytes***

Laura A. A. de la Rosa Carrillo ..... 21

Calcium and cyclic AMP exert contrary effects in various types of cells. In human lymphocytes, a cytosolic  $[Ca^{2+}]$  increment is needed for cell activation, while an increase of cAMP inhibits cell proliferation through various pathways, including inhibition of calcium signaling. In the present work, we studied the effect of adenylyl cyclase and protein kinase A (PKA), inhibitors and activators, over the two phases of calcium signaling in human lymphocytes: the store depletion and capacitative entry, respectively. These studies were carried out in individual cells loaded with the cell permeant fluorescent probe Fura2-AM. Our results showed that both an inhibition and over-activation of PKA inhibited capacitative calcium entry, while adenylyl cyclase activation with forskolin reduced the release of calcium from thapsigargin-sensitive stores, through a mechanism apparently independent of PKA activation.

### ***Metallic and semiconductive nanoparticles in colloidal dispersions. A review of experimental and theoretical aspects, and potential applications***

David Díaz ..... 27

The main objective of this work is to show a general, novel and direct synthesis route of metallic and semiconductor nanoparticles (transition metal oxides and sulfides) in colloidal dispersion. The dispersion media in which the nanoparticles are is an aprotic and polar solvent such as the DMSO. The basicity of the solvent plays an important role during the course of the synthesis reaction. Metallic carboxylates are used as starting materials. For the characterization of the colloidal dispersions the electronic absorption and emission, in the UV-visible region, the  $^1H$ NMR, far-FTIR and powder X-ray diffraction spectroscopies have been used. HR-TEM has allowed stating the average size nanoparticle in the range 2 to 7 nm, with very narrow size distributions.

### ***Supramolecular structures generated by cyclodextrins***

Emilio Álvarez Parrilla ..... 35

This review contains a brief introduction about the development of supramolecular chemistry, a new field of the chemistry science. The use of cyclodextrins as hosts molecules utilized in supramolecular chemistry is also described. Special attention is devoted to the complexation of ditopic guests by  $\beta$ -cyclodextrin dimers and trimers, which can lead to the generation of linear or branched supramolecular polymers.

### ***Future trends of genetically modified organisms***

Mario Gaytán Alcocer ..... 43

GMO (Genetically Modified Organisms or transgenic) are organisms in which at least one new gene is inserted, and it is different from wild genome.

The most common GMOs crops are soybean, corn, cotton and canola, and are designed to solve economic problems and specific concerns.

Gene transfer involves the introduction of genetic information (in general in the form of DNA) into the genome of a cell. In most cases, the stable expression of this information is required. As new technology, genetic engineering requires specific assessment, as soon as the lack of risk for humans and the environment has been established. On the other hand, we must never forget ecological, cultural and productive aspects for each country.

***Heavy metals phytoremediation and nanoparticle formation by alfalfa plants***

Jorge L. Gardea-Torresdey, Eduardo Gomez, Jose R. Peralta-Videa, Kirk J. Tiemann,  
Jason G. Parsons, Horacio Troiani y Miguel Jose-Yacaman .....49

Phytoremediation, the use of plants to clean up contaminated water and soils, has become a promising alternative to recover metals in an environmentally friendly manner. Some plant species used for phytoremediation purposes can also absorb precious metals from solid media. Laboratory and greenhouse studies showed that alfalfa shoots of plants exposed separately, for 15 days, to 320 mg L<sup>-1</sup> of KAuCl<sub>4</sub> and AgNO<sub>3</sub>, concentrated 264 and 120 mg of gold and silver per kg of dry biomass, respectively. Additionally, transmission electron microscopy (TEM) studies showed that these plants formed gold and silver nanoparticles inside the tissues. These results showed for the first time the possibility of synthesizing quantum dots in living plants, and that it is possible to produce other nanostructures of significant value for science and technology.





# PRESENTACIÓN

Memorias de la IV Semana de Química de  
la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez  
1-4 de abril del 2003

En este tomo especial aparecen varias contribuciones que se presentaron durante la IV Semana de Química, realizada por los estudiantes en honor al maestro en Ciencias Antonio de la Mora Covarrubias, que por sus facetas académicas, ha ganado el aprecio del estudiante de grado de la carrera de Química. Cabe mencionar que los restos de la colección entomológica de la Escuela de Agricultura Hermanos Escobar (que en su tiempo fue una de las colecciones más completas a nivel nacional) ubicada en Ciudad Juárez, fueron rescatados por el M. en C. De la Mora, quien actualmente mantiene dicha colección en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Durante el evento, la participación de colegas nacionales y extranjeros fomentó el intercambio de ideas, proyectos y expectativas a cada uno de los asistentes. Estoy seguro que el estímulo que los estudiantes de esta Universidad recibieron de las distintas ponencias, fue de ayuda en sus planes como futuros profesionistas y potenciales estudiantes de posgrado.

Dentro de los compromisos universitarios, reconocidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), la Secretaría de Educación Pública (SEP), el Programa de Mejoramiento del Profesorado (Promp) y el Sistema Nacional de Investigadores (SNI), se encuentra la difusión del quehacer científico, una de las actividades universitarias. En esta perspectiva, la Semana de Química es un vector de difusión de la investigación científica, tanto de nuestra casa de estudios, como de otras entidades federativas, cumpliendo con ello la política nacional de incrementar el número de maestros y doctores en todas las áreas de ciencias exactas, biológicas y aplicadas, mediante el estímulo y difusión de la ciencia en México, y qué mejor estímulo que el estudiante escuche personalmente a los investigadores invitados, e incluso sostenga charlas con ellos y cuestione los posgrados existentes en sus universidades.

Somos una universidad joven, fundada en 1973, la IV Semana de Química se celebró en el marco del 30 aniversario de la UACJ. Las palabras de nuestro rector en términos de investigación científica fueron muy claras: “La investigación convive con la academia y cumple su compromiso de generar conocimiento. Las líneas de investigación institucional atienden a un criterio de pertinencia, teniendo el propósito de aportar resultados de aplicación en nuestro entorno...”.

No cabe duda que en general, la Semana de Química es parte de la visión de la UACJ, la cual “...promueve la diversidad cultural y fomenta la identidad nacional y regional; con acceso pleno a la oferta educativa mundial”.

Este tomo especial de la revista Ciencia en la frontera, publicación del Instituto de Ciencias Biomédicas, recoge por vez primera las memorias de un evento que es importante para la sociedad de la frontera, ya que difunde el conocimiento generado tanto en universidades nacionales como de los Estados Unidos de Norteamérica, es además abierto al público en general; es importante para el estudiante, porque lo acerca a distintos campos de la investigación científica, dándole la oportunidad de visualizar, por ejemplo, su tema de tesis; para los profesores e investigadores y para las Instituciones de Educación Superior, la

Semana de Química es un evento importante porque establece vínculos entre los investigadores y sus instituciones, que se ven favorecidas por el intercambio académico y la potencial creación de redes académicas.

Finalmente, deseo agradecer a todos los participantes de esta edición especial: a los autores de los artículos, por su dedicación al escrito; a Jorge Gardea-Torresdey y José Peralta Videla, por su tiempo en la edición; a Emilio Álvarez Parrilla, por el auxilio en la impresión; y en general a todo el Consejo Editorial de la revista Ciencia en la frontera, que me ha guiado y dado ánimos para editar este tomo especial y en general a todos los participantes de la IV Semana de Química, quienes hicieron de ésta, un espacio de ideas, oportunidades y crecimiento académico.

¡Gracias!

Alejandro Martínez  
Responsable de la IV  
Semana de Química, UACJ

# *Función de las proteínas que unen nucleótidos de guanina en la fecundación*

*Jesús García Soto, Guadalupe Martínez Cadena, Fernando Covián Nares, Salvador Manzo Ávalos y Juana López Godínez\**

El óvulo contiene miles de vesículas secretoras (gránulos corticales) que son importantes en la fertilización. En respuesta a un espermatozoide, dichas vesículas secretan su contenido modificando la capa vitelina del óvulo, generando una barrera que impide el ingreso de más de un espermatozoide. Durante la ovogénesis, los gránulos corticales son formados y translocados del citoplasma a la región cortical del oocito. Estudiamos la localización intracelular de la proteína Rho, la cual es una GTPasa de la superfamilia de Ras, e investigamos su influencia en la translocación de los gránulos corticales durante la ovogénesis. Concluimos que la proteína Rho se sintetiza muy temprano en la ovogénesis y, al final de ésta, se asocia con los gránulos corticales. Ya que la inactivación de Rho impide la translocación de los gránulos corticales, es posible que Rho regule este fenómeno a través de los microfilamentos. Al término de la translocación de los gránulos, el óvulo adquirirá la capacidad de ser fertilizado.

## **Introducción**

La fecundación representa el mecanismo que utilizan las especies de reproducción sexual para propagarse y perpetuarse a través del tiempo, y consiste en la unión de dos células altamente especializadas: el óvulo y el espermatozoide. La célula resultante es el cigoto, cuya identidad genética es única y diferente a la de sus progenitores. La fecundación presenta dos aspectos importantes: la fusión de dos núcleos haploide que reúnen en el cigoto una selección de genes de dos individuos distintos, o de uno solo en el caso de la autofecundación, y la iniciación del desarrollo de un nuevo individuo. El estudio de la fecundación

requiere de la identificación y caracterización de todos los mecanismos celulares y moleculares que participan en ella. Para su estudio se han utilizado diversos modelos biológicos como el ratón y hámster, sin embargo, uno de los modelos más utilizados son los invertebrados marinos, especialmente el erizo de mar. Éste representa un modelo biológico bastante atractivo para llevar a cabo estudios de fecundación y, a pesar de la distancia evolutiva que hay entre los equinodermos y mamíferos, existen evidencias que demuestran que muchos de los mecanismos moleculares de la fecundación son semejantes en ambos grupos. Por lo tanto, las conclusiones a las que se puede llegar a partir de los resultados obtenidos en erizo de mar, podrán dar evidencias directas de lo que sucede en mamíferos.

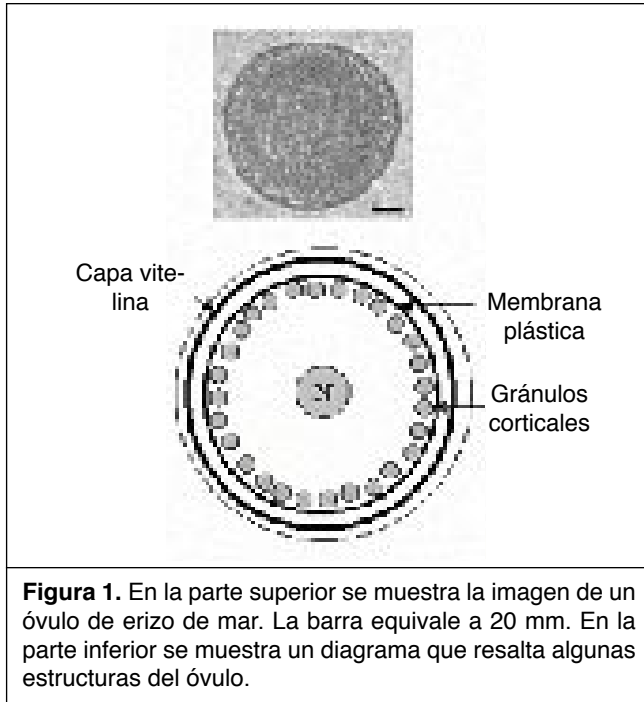
Desde el punto de vista experimental, los erizos de mar son un modelo ideal para trabajar en la fecundación, ya que la reproducción de estos organismos se lleva a cabo en el agua de mar. Esta condición es capaz de repetirse fácilmente en el laboratorio. Se pueden obtener erizos todo el año y la disponibilidad de gametos es muy alta, ya que una hembra llega a producir  $1 \times 10^6$  óvulos por ml, mientras que un macho  $3 \times 10^{10}$  espermatozoides por ml de semen. La figura 1 muestra algunos aspectos de la morfología del óvulo.

Para que la fertilización sea fructífera, ambos gametos transitan a través de etapas de maduración, conocidas como ovogénesis y espermatogénesis. A su vez, la fusión de los gametos maduros da lugar al cigoto, quien emprende un complejo programa de desarrollo y diferenciación celular. Durante la maduración, así como en la fertilización y en el desarrollo, intervienen vías de transducción de señales que modulan múltiples procesos celulares.

## **Transducción de señales**

Las células tienen la capacidad de responder a los estímulos o señales que desde el entorno arriban a su superficie. Tales señales, que acarrear información, pueden ser sustancias químicas como

\* Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato



**Figura 1.** En la parte superior se muestra la imagen de un óvulo de erizo de mar. La barra equivale a 20  $\mu$ m. En la parte inferior se muestra un diagrama que resalta algunas estructuras del óvulo.

las hormonas y nutrientes o físicas como la luz y la gravedad. Al arribar a la superficie celular, una señal puede ser capturada por receptores, amplificada y transmitida al citoplasma, donde culmina en una determinada respuesta celular que puede ser un proceso de diferenciación celular, de proliferación, secreción o activación del metabolismo, entre otros.

En la recepción y transmisión de señales biológicas participa una compleja red de elementos constituidos por diversas proteínas, algunas de las cuales generan segundos mensajeros. El conjunto de tales elementos constituye una vía de transducción celular.

Las proteínas que unen nucleótidos de guanina, también denominadas proteínas G, juegan un papel importante en la transducción de señales, ya que acoplan un receptor activado con una proteína efectora. Son capaces de modular enzimas como la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C o canales iónicos así como la expresión de genes, el transporte intravesicular y el rearrreglo del citoesqueleto de actina [1]. Existen decenas de proteínas G con características estructurales básicas, por lo que se han clasificado en heterotriméricas y monoméricas.

Las proteínas G heterotriméricas están conformadas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  [2], las cuales se mantienen como un trímero cuando a una GDP; a se disocia de  $\beta$  y  $\gamma$  cuando une GTP y es la forma funcionalmente activa. La transición entre los estados activo e inactivo depende de la actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad  $\alpha$ . Entre las subunidades  $G\alpha$  mejor caracterizadas están

la  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_o$  y  $G_z$ . Algunas de ellas son sustratos para toxinas bacterianas que funcionan como ADP-ribosiltransferasas como  $G_s$  que es sustrato para la toxina de *V. colera* y  $G_i$ / $G_o$  para la toxina de *B. pertussis* [3]. Esta propiedad es una ventaja muy útil para su identificación.

Las proteínas G monoméricas se han agrupado en la superfamilia de Ras y son funcionalmente análogas a la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas. Cuentan, además, con proteínas accesorias que contribuyen a su función como GEF, GDI y GAP. En eucariotes existen más de 100 proteínas G monoméricas, desde levaduras hasta el hombre y se agrupan en la superfamilia de Ras [1]. Ésta comprende las familias de Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf y Ran con sus correspondientes subfamilias.

Las proteínas de la familia de Rho participan en múltiples procesos celulares, entre los que se cuentan el rearrreglo del citoesqueleto de actina, progresión del ciclo celular, movilidad celular, tráfico intracelular de vesículas y apoptosis [4]. La subfamilia de Rho comprende primordialmente a las isoformas denominadas A, B y C, las cuales son sustratos específicos para la actividad enzimática de mono(ADP-ribosil)transferasa de la toxina C3 de *Clostridium botulinum* [5].

In vivo, C3 inactiva a Rho impidiendo la interacción con su efector y, por ende, aquellas funciones dependientes de Rho. Las proteínas Rho se sintetizan en el citosol y, mediante una isoprenilación, se asocian con la membrana plasmática donde son funcionalmente activas; también es posible ubicar a Rho en vesículas secretoras [6,7].

### Diferenciación de un oocito en un óvulo maduro

Un oocito u óvulo inmaduro es incapaz de ser fertilizado y, en caso de serlo, se vuelve polispérmico y eventualmente muere [8]. De aquí que durante la oogénesis se desarrollan mecanismos de diferenciación tendientes a convertir al oocito en un óvulo maduro, es decir, provisto de las herramientas moleculares que le ayudarán a prevenir la polispermia durante la fertilización y, a la vez, encender y operar el programa de desarrollo del embrión.

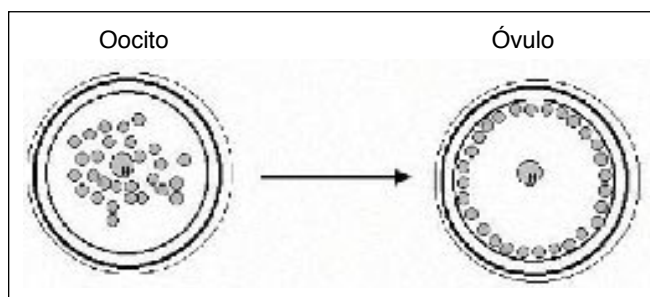
Poco se conoce sobre los mecanismos implicados en la oogénesis. En erizos de mar, la etapa más tardía de la oogénesis, que convierte al oocito en un óvulo fertilizable, es un proceso de maduración meiótica que se distingue por el desplazamiento de la vesícula germinal a la región cortical, seguido por la disolución de la membrana de la vesícula, la desaparición del nucleolo y la generación de dos cuerpos polares producto de la primera y segunda división meiótica para finalmente dar lugar al pronúcleo [9]; este signo visible de la maduración de un oocito se conoce como rompimiento de la vesícula germinal.

Durante las etapas tempranas de la oogénesis, se generan en el Aparato de Golgi miles de vesículas que se acumulan en el cito-

plasma del oocito y que, en un momento de la oogénesis, migran hacia la corteza del oocito para adherirse a la cara interna de la membrana plasmática, formando una monocapa muy compacta de vesículas secretoras (Fig. 2). Este fenómeno es un signo inequívoco de la maduración del oocito. Segundos después de que un espermatozoide fertiliza a un óvulo maduro, el contenido de los gránulos corticales es liberado al espacio perivitelino del óvulo a través de un proceso de exocitosis dependiente de una señal de  $Ca^{2+}$  proveniente de depósitos intracelulares [10]. La exocitosis de los gránulos corticales libera enzimas hidrolíticas y proteínas estructurales que transforman la capa vitelina del óvulo en una barrera infranqueable a los espermatozoides supernumerarios, bloqueando la polispermia. Inicia entonces el desarrollo embrionario.

Tanto el rompimiento de la vesícula germinal como la translocación de los gránulos corticales (Fig. 2), son signos de la maduración de un oocito para convertirse en un óvulo maduro, listo para ser fertilizado y prevenir la polispermia; ambos procesos se encuentran estrechamente ligados. Por lo anterior, la translocación de los gránulos corticales constituye un paso crucial en la maduración, siendo un proceso finamente regulado, por lo que cabe preguntarse: ¿Cuál es la señal que determina el desplazamiento de los gránulos corticales? ¿Qué proteínas están implicadas en este tráfico intracelular? ¿Cómo se regulan tales proteínas? Recientemente se encontró que el citoesqueleto de actina participa en el movimiento de los gránulos corticales [11,12], por lo que pensamos que si Rho se asocia con estas vesículas [6], esta proteína puede estar participando en dirigir su translocación.

A continuación se presentan algunos resultados que demuestran la participación de la proteína G tipo Rho en la maduración. También se muestran algunos avances relativos al posible papel de Rho en el desarrollo.



**Figura 2.** La translocación de los gránulos corticales desde el citoplasma a la región cortical es un paso limitante en la maduración del oocito y fundamental en la prevención de la polispermia.

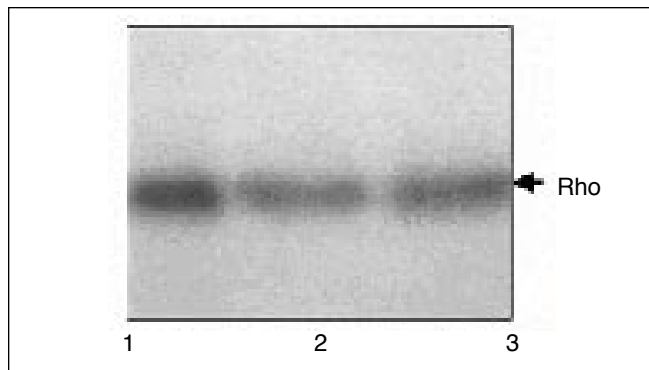
### El tráfico intracelular de los gránulos corticales es regulado por la proteína g tipo Rho

Se mencionó con anterioridad que Rho es susceptible de ser ADP-ribosilada por la toxina C3 de *Clostridium botulinum*. En la reacción catalizada por C3, el NAD dona la porción correspondiente a ADP-ribosa a un residuo de Asparagina de la proteína Rho. Si en un ensayo bioquímico se utiliza  $[^{32}P]NAD$ , la  $[^{32}P]ADP$ -ribosa incorporada a Rho puede ser detectada mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida seguido de la exposición del gel a una película de rayos-X para poder detectar la proteína Rho. Con esta metodología, se realizó un experimento para demostrar mediante ADP-ribosilación con la toxina C3 la presencia de Rho en los oocitos. Para esto, se preparó un homogenado con oocitos recién aislados y se sometió a ultracentrifugación (100,000g, 1 h); las membranas y el citosol se incubaron con  $[^{32}P]NAD$  10 mM y 0.1 ng de la toxina C3. Al cabo de una hora las muestras se sometieron a electroforesis y posterior autorradiografía (Fig. 3).

La Figura 3 (carril 1) muestra la presencia de una proteína ADP-ribosilada. Esta proteína se distribuye entre el citosol y las membranas (carriles 2 y 3, respectivamente). La especificidad que tiene C3 para ADP-ribosilar a Rho significa que es incapaz de ADP-ribosilar a otra proteína, por lo que se concluye que la proteína ADP-ribosilada en los oocitos corresponde a Rho. Experimentos de "western blot" confirman la presencia de esta proteína.

Mediante microscopía de epifluorescencia, se estudió la distribución intracelular de Rho en el oocito. Previos resultados mostraban que en el óvulo ya maduro la proteína Rho se encuentra asociada a gránulos corticales, por lo que nos preguntamos qué función o funciones podría tener Rho al estar presente en estos organelos, así como en qué momento del desarrollo del oocito, la proteína Rho se incorpora al gránulo cortical. Para tratar de contestar estas preguntas hicimos un experimento de inmunofluorescencia indirecta, para lo cual incubamos cortes de gónadas fijadas en parafina con los anticuerpos primarios anti-Rho y anti-hialina; con este último anticuerpo podríamos obtener información sobre la localización intracelular de los gránulos corticales, ya que la hialina es una proteína exclusiva de estos gránulos. Posteriormente, los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos de distintos colores que van dirigidos contra los anticuerpos primarios y se observó al microscopio. En el caso de oocitos con vesícula germinal, los cuales se encuentran en etapas tempranas de la maduración con los gránulos corticales aún concentrados en el citoplasma, se encontró que la proteína Rho está tanto en el citosol como unida a gránulos corticales, y también se observaron gránulos sin aún contener a Rho.

Este resultado abría la posibilidad de evaluar si Rho tenía algo que ver con el movimiento intracelular de los gránulos corticales. Para ello era importante utilizar una estrategia que permitiera inactivarla. Con base en que la ADP-ribosilación por C3 inactiva



**Figura 3.** Detección de la proteína Rho en fracciones celulares de oocitos, mediante  $[^{32}\text{P}]\text{ADP}$ -ribosilación con la toxina C3 de *C. botulinum*. Después de  $[^{32}\text{P}]\text{ADP}$ -ribosilar, las proteínas se separaron por electroforesis y la marca radiactiva se reveló por autorradiografía. Carriles: 1. homogenizado de oocitos; 2. citosol y 3. membranas.

a Rho, procedimos a incubar con la toxina a oocitos en estadio de vesícula germinal. Comprobamos que C3 efectivamente entró al oocito y ADP-ribosiló a Rho in situ. Con esta observación, evaluamos la influencia de la ADP-ribosilación por C3 sobre dos aspectos importantes y característicos de la maduración, el rompimiento de la vesícula germinal y la aparición del pronúcleo. Observamos que conforme se incrementó la concentración de C3, se disminuyó el porcentaje de células que lograron llevar a cabo el rompimiento de la vesícula germinal. Asimismo, mediante el uso de marcaje con anticuerpos se observó que algunas células presentan un retraso en el movimiento de los gránulos corticales.

Lo anterior nos permite determinar que Rho regula de algún modo el movimiento de los gránulos corticales durante la maduración del oocito. En conclusión, durante la ovogénesis los GC se acumulan uniformemente en todo el citoplasma hasta su maduración, momento en el cual se translocan hacia la periferia celular. Los GC se mantienen alineados a lo largo de la membrana plasmática hasta que ocurre la fertilización.

### Rho en el desarrollo temprano del embrión

Cuando el óvulo es fertilizado, sufre inmediatamente cambios muy dramáticos en su fisiología. Uno de los múltiples procesos que ocurren es la reacción cortical, la cual consiste en la exocitosis

dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de los gránulos corticales localizados en la corteza del óvulo (ver Fig. 4).

Mediante esta exocitosis, los gránulos corticales liberan su contenido hacia el espacio perivitelino. El contenido consiste en enzimas y componentes estructurales, todos los cuales contribuirán a remodelar la capa vitelina, transformándola en la “membrana de fertilización”, misma que constituye una barrera que previene la polispermia.

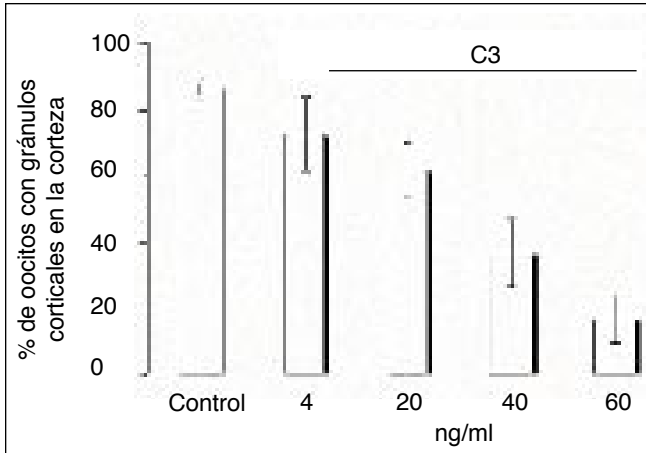
La exocitosis de los gránulos corticales constituye entonces un proceso fundamental en la fertilización, incluso en el humano, por lo que su conocimiento a nivel molecular es crítico para asegurar el éxito de la fertilización. Incluso, en la exocitosis de los gránulos corticales intervienen proteínas G de bajo peso molecular [13, 14].

Otro proceso es la fusión de los pronúcleos del espermatozoide y del óvulo, restableciendo el estado diploide. El proceso de desarrollo temprano que se caracteriza por la síntesis de proteínas y la replicación del ADN, arranca minutos después de la fertilización. Alrededor de los 90 minutos comienzan a notarse los primeros signos de la división nuclear y citoplásmica. El anillo contráctil o surco de división celular, de donde parte la división citoplásmica, está constituido por Rho, actina y miosina, entre otras proteínas. En experimentos encaminados a estudiar el papel de Rho en el desarrollo temprano, observamos que la inactivación de Rho con C3 impide la formación del anillo contráctil y la localización de Rho en la zona ecuatorial del cigoto (Fig. 5).

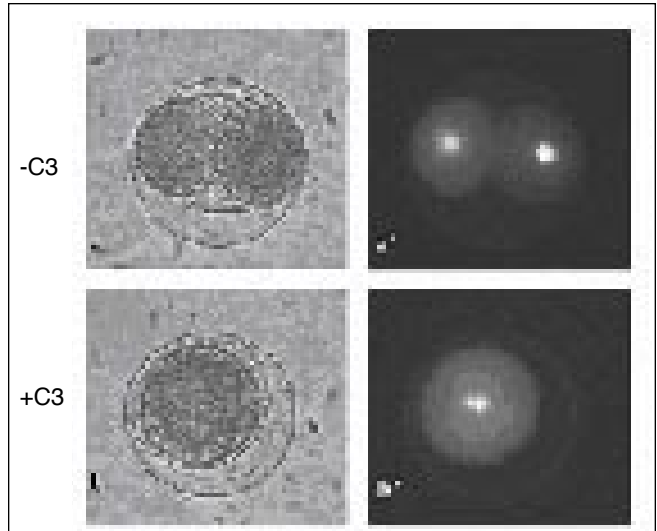
Actualmente nos encontramos estudiando a qué nivel ocurre la participación de Rho y estamos tratando de caracterizar las moléculas con las que posiblemente interactúa.

### Conclusiones

La unión del óvulo y el espermatozoide es uno de los momentos culminantes de la naturaleza, ya que constituye una de las estrategias para la continuación de las especies. Tanto el espermatozoide como el óvulo llegan a este crucial momento después de haber transitado por procesos de diferenciación mediante los cuales logran adquirir las herramientas moleculares que les permitirán cumplir exitosamente su función. La comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en la fecundación, puede contribuir a resolver diversas problemáticas como las relacionadas con la salud reproductiva.



**Figura 4.** La inactivación de Rho con la toxina C3 impide la migración de los gránulos corticales a la periferia del oocito.



**Figura 5.** La inactivación de Rho mediante ADP-ribosilación con la toxina C3 de *C. botulinum* bloquea la primera división celular del cigoto a' y b' son tinciones del DNA con Hoechst 33258.

## REFERENCIAS

- Takai, Y., Sasaki, T. y Matozaki, T. (2001) "Small GTP-binding proteins". *Physiol Rev* 81, 153-208.
- Krauss, G. (2000) *Biochemical of G proteins signal transduction*. Wiley. pp. 173-215.
- Neer, E.J. (1995) "Heterotrimeric proteins: organizers of transmembrane signals". *Cell* 80, 249-257.
- Symons, M. y Settleman, J. (2000) "Rho family GTPases: more than simple switches". *Trends Cell Biol* 10, 415-419.
- Just, I., Hofmann, F., Genth, H. y Gerhard, R. (2001) "Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins". *Int J. Med. Microbiol.* 291, 1187-1195.
- Cuéllar-Mata, P., Martínez-Cadena, G., López-Godínez, J., Obregón, A. y García-Soto, J. (2000) "The GTP-binding protein RhoA localizes to the cortical granules of *Stroglyocentrotus purpuratus* sea urchin egg and is secreted during fertilization". *Eur. J. Cell. Biol.* 79, 81-91.
- Castellano, L.E., Martínez-Cadena, G., López-Godínez, J., Obregón, A. y García-Soto, J. (1997) "Subcellular localization of the GTP-binding protein Rho in sea urchin sperm". *Eur. J. Cell. Biol.* 74, 329-335.
- Zucker, R.S. y Steinhardt, R.A. (1978) "Prevention of the cortical reaction in fertilized sea urchin eggs by injection of calcium-chelating ligands". *Biochim. Biophys. Acta* 541 459-466.
- Berg, L.K. y Wessel, G.M. (1997) "Cortical granules of the sea urchin translocate early in oocyte maturation". *Development* 124, 1845-1850.
- Runft, L.L., Jaffe, L.A. y Mehlmann, L.M. (2002) "Egg activation at fertilization: Where it all begins". *Dev. Biol.* 245, 237-254.
- Connors, S.A., Kanatsu-Shinohara, M., Schultz, R.M. y Kopf, G.S. (1998) "Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs". *Dev Biol* 200, 103-115.
- Wessel, G.M., Conner, S.D. y Berg, L. (2002). "Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte". *Development* 129, 4315-4325.
- Conner, S. D. y Wessel, G.M. (1998) "Rab3 mediates cortical granule exocytosis in the sea urchin egg". *Dev. Biol.* 203, 334-344.
- López-Godínez, J., Garambullo, T.I., Martínez-Cadena, J. y García-Soto, J. (2003) "Mastoparan induces Ca<sup>2+</sup>-independent cortical granule exocytosis in sea urchin eggs". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 13-16.



# *Envejecimiento de las semillas: síntomas, causas y mecanismos de protección*

**Irma Bernal Lugo y Adriana Camacho\***

El envejecimiento de semillas en almacén comprende dos fases. Una de relativa estabilidad, donde la pérdida de viabilidad es lenta y otra donde la pérdida de viabilidad es dinámica. Ambas fases están modeladas en las curvas de sobrevivencia. El estado vítreo del citoplasma y el sistema enzimático antioxidante se han propuesto como mecanismos que evitan las reacciones deletéreas, y por tanto operarían en el sector de relativa estabilidad. El progreso rápido del deterioro en el sector de pérdida dinámica de la viabilidad podría deberse a la pérdida parcial o total del estado vítreo y a un incremento en la velocidad de producción mitocondrial del radical superóxido; así como también a la disminución de los sistemas antioxidantes para contender con los radicales de oxígeno generados durante la germinación de la semilla. Esto desencadenaría una serie de reacciones oxidativas responsables quizás del conjunto de síntomas que caracterizan al envejecimiento como son: la pérdida de integridad membranal, la disminución en la actividad enzimática y de síntesis de macromoléculas; así como la acumulación de mutaciones cromosomales.

## **Introducción**

El envejecimiento es un proceso que afecta a todos los seres vivos, incluyendo las semillas, cuyo envejecimiento se caracteriza por una pérdida gradual de la viabilidad (capacidad para germinar) y del vigor (capacidad para germinar en condiciones adversas) que termina con la muerte. Cuando las semillas envejecen disminuye la productividad, se reduce su utilización en la industria procesadora de alimentos para consumo humano y pecuario.

## **Factores que incrementan la velocidad de envejecimiento de las semillas**

### **Humedad relativa y temperatura**

La humedad relativa (HR) y la temperatura (T) son los principales factores externos que influyen en el vigor y la viabilidad de las semillas. Los efectos de estos dos factores son interdependientes. Las semillas de la mayoría de las diversas especies y cultivares pierden viabilidad rápidamente cuando se almacenan a HR de 80% y T de 25°C a 30°C, pero pueden ser mantenidas por 10 o más años a HR de 50% y T de 5°C.

### **Factores genéticos**

Diversos autores han demostrado que cuando las semillas de diversas especies o genotipos de una misma especie se almacenan en condiciones similares de HR y T, su velocidad de envejecimiento es diferente (Priestley, 1985; Moreno et al., 1987; Bernal-Lugo et al., 1995; Bernal-Lugo y Leopold, 1998).

### **Condiciones de cultivo**

Factores ambientales como el fotoperiodo, el tipo de suelo, la temperatura y la precipitación pluvial que prevalecen durante el desarrollo y cosecha de las semillas influyen sobre el contenido de sustancias de reserva, así como también en el vigor y longevidad de las semillas (Austin, 1972; Ellis et al., 1993).

### **Alteraciones fisiológicas, celulares y bioquímicas del envejecimiento de las semillas**

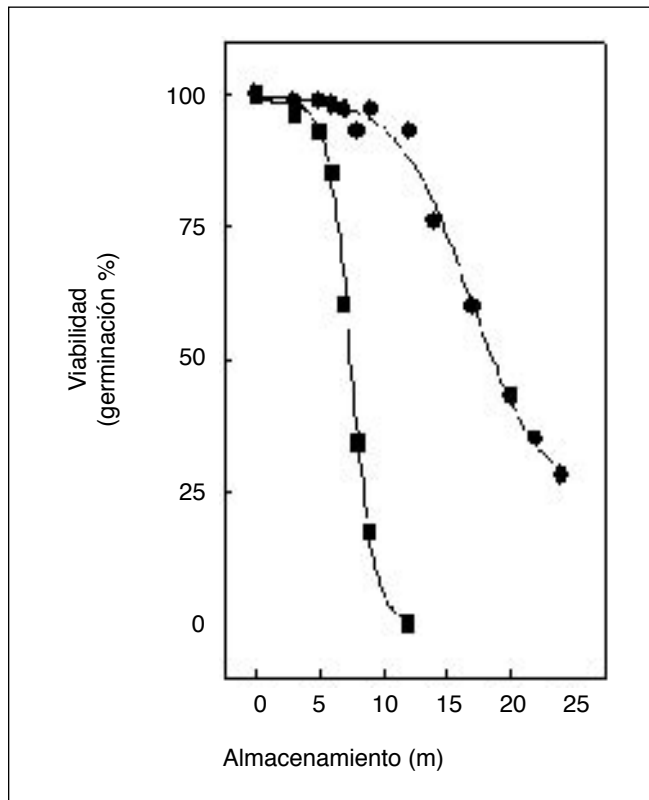
El envejecimiento de las semillas se manifiesta en alteraciones de la germinación (disminución en la velocidad de germinación y/o en la viabilidad del lote) y desarrollo de las plántulas. Estos cambios fisiológicos son el reflejo de la suma de los cambios bioquímicos y celulares que se producen durante el tiempo de almacenamiento. A nivel bioquímico, el envejecimiento de semillas se manifiesta en una disminución en la actividad metabólica durante la germinación, alteraciones a nivel de biomoléculas de reserva, reducción en las actividades enzimáticas y una disminución en la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas, así como un incremento en la salida de iones y metabolitos como glucosa y

\* Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, México, D. F. 04510, México. irmofel@servidor.unam.mx

aminoácidos. Todos estos cambios se manifiestan en un decremento en la habilidad para emerger cuando la germinación ocurre en condiciones de estrés y una mayor susceptibilidad de las plántulas a los patógenos.

### Fases del envejecimiento de las semillas

El envejecimiento de semillas se realiza en dos fases: una de relativa estabilidad y otra de pérdida de viabilidad logarítmica. La curva de sobrevivencia de un lote de semillas se genera al graficar la viabilidad (% de germinación) contra diversos tiempos de almacenamiento de dicha población (Fig. 1). Estas curvas muestran dos fases: la primera es una fase inicial de relativa estabilidad que precede a la fase acumulativa de mortalidad y la segunda que se caracteriza por una pérdida dinámica de la viabilidad. El periodo de duración de la primera fase depende de las condiciones de almacenamiento (Bradford, 1993).



**Figura 1.** Curvas de sobrevivencia de frijol y soya almacenado a 75% (▲) y 100% (■) de humedad relativa y 20°C

### El estado vítreo y el mecanismo enzimático antioxidante de la semilla contribuyen a mantener la viabilidad en el almacén

El hecho de que las curvas de sobrevivencia presenten dinámicas diferentes de la pérdida de viabilidad, sugiere que las semillas poseen un mecanismo de protección contra el envejecimiento, el cual es más eficaz en la fase de relativa estabilidad que en la de envejecimiento logarítmico.

La evidencia experimental aportada por diversos autores señala que a medida que la semilla se deshidrata, durante su desarrollo, la compleja mezcla de moléculas presente en el citoplasma se vitrifica. Este estado vítreo o de alta viscosidad limita la movilidad molecular y por tanto las reacciones deletéreas (Leopold et al., 1994; Bernal-Lugo y Leopold, 1995; 1998; Buitink et al., 2000). La pérdida del estado vítreo es promovida por un aumento en la temperatura o en el contenido de humedad, factores que afectan la velocidad de envejecimiento.

La transición del periodo de relativa estabilidad al de envejecimiento dinámico estaría asociada con la pérdida gradual de la capacidad de la semilla para formar el estado vítreo (Jun y Leopold, 1992; Bernal-Lugo y Leopold, 1995) y a un incremento de las reacciones oxidativas (Wilson y McDonald, 1986; Hendry, 1993; Smith y Berjark, 1995), tales como la deshidrogenación enzimática (Zhnag et al., 1994), la oxidación de aldehídos y proteínas (Stadtman, 1992), la reacción de Maillard (Sun y Leopold, 1995) y la formación de especies reactivas de oxígeno (Hendry, 1993). Todas las reacciones antes mencionadas podrían realizarse durante el almacenamiento de la semilla y sus productos ser eliminados durante las primeras fases de la germinación, como es el caso de los aductos de lipoperoxidación (Camacho, 1999) o los de Maillard (Sun y Leopold 1995), siempre y cuando la semilla almacenada mantenga la actividad de sus sistemas antioxidantes.

### El estado hiperoxidativo en que germina la semilla envejecida contribuye a su pérdida de viabilidad

En la fase de envejecimiento dinámico, la actividad del sistema enzimático antioxidante disminuye (Bernal-Lugo y Camacho, 2000) y la velocidad de producción del radical superóxido en la mitocondria se incrementa (Camacho, 2003; datos no publicados), de tal forma que la semilla envejecida germina en un ambiente hiperoxidativo, como consecuencia del desequilibrio entre la generación del radical superóxido y su eliminación. La acumulación de las especies reactivas de oxígeno contribuye a que se establezcan las diversas reacciones deletéreas que caracterizan el envejecimiento de semillas.

## Conclusiones

Las diferencias en la velocidad de envejecimiento mostradas por cada uno de los sectores en la curva de sobrevivencia de las semillas, podrían deberse a la existencia y persistencia de mecanismos de protección contra las reacciones dañinas. Como mecanismos de protección se proponen al estado vítreo y al sistema enzimático antioxidante; y como causa de la fase logarítmica de envejecimiento al incremento en la velocidad de producción mitocondrial del radical superóxido.

## REFERENCIAS

- Austin RB (1972) "Effects of environment before harvesting on viability". En EH Roberts (ed.) *Viability of seeds*. Syracuse University Press, pp. 114-149.
- Bernal-Lugo I, Camacho A, Carballo A (2000). "Effects of seed ageing on the enzymic antioxidant system of maize cultivars". En M. Black, KJ Bradford, J. Vazquez-Ramos (eds.) *Seed Biology Advances and applications*. CABI Publishing, pp. 151-160.
- Bernal-Lugo I, Leopold AC (1992). "Changes in soluble carbohydrates during seed storage". *Plant Physiol.* 98: 1207-1210.
- Bernal-Lugo I, Leopold AC (1995). "Seed stability during storage: Raffinose content and seed glassy state". *Seed Sci. Res.* 5: 75-80.
- Bernal-Lugo I, Leopold AC (1998). "The dynamics of seed mortality". *J. Exp. Bot.* 49: 1455-1461.
- Bradford KJ, Tarquis AM, Duran JM (1993). "A population-based threshold model describing the relationship between germination rates and seed deterioration". *J. Exp. Bot.* 44: 1225-1234.
- Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra FA (2000). "Molecular mobility in the cytoplasm: an approach to describe and predict lifespan of dry germplasm". *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97: 2385-2390.
- Camacho Villanueva A (1999). "Producción y detoxificación enzimática de especies reactivas de oxígeno en semillas de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento". Tesis de Maestría Facultad de Química, UNAM
- Hendry GAF (1993). "Oxygen, free radicals processes and seed longevity". *Seed. Sci. Res.* 3:141-153.
- Leopold AC, Sun WQ, Bernal-Lugo I (1994). "The glassy state in seeds". *Seed Sci. Res.* 4: 267-274.
- Moreno Martínez E, Ramirez González M, Mendoza Ramírez M, Valencia Ramírez G. (1987) "Comparison of mexican maize races stored under adverse humidity and temperature. En *Recent advances in the conservation and utilization of genetic resources*". Proceedings of the global maize germplasm workshop, CIMMYT, México, pp. 94-98.
- Priestley DA (1986) "Morphological, structural, and biochemical changes associated with seed aging". En *Seed Aging*. Cornell University Press, pp. 125-196.
- Smith MT, Berjak P (1995). "Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds". En J Kigel, G Gallil (eds) *Seed Development and germination*. Marcel Dekker, Inc. NY. pp. 701-746.
- Sun WQ, Leopold AC (1995). "The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds". *Physiol Plant* 94: 94-104.
- Stadtman E (1992). Protein oxidation and ageing *Science* 257: 1220-1224.
- Wilson DO, MacDonald Jr MB (1986). "The lipid peroxidation model of seed ageing". *Seed Sci technol* 14: 269-300.
- Zhang M, Maeda Y, Furrihata Y, Nakamaru Y, Esahi Y (1994). "A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves". *Seed Sci Res* 4: 49-56.



# *El AMP cíclico modula la señal intracelular de $Ca^{2+}$ en linfocitos humanos\**

Laura A. A. de la Rosa Carrillo\*\*

El calcio y el AMP cíclico producen efectos contrarios en diversos tipos de células. Algunos autores han encontrado que en linfocitos humanos el  $Ca^{2+}$  es una señal indispensable para la activación celular, mientras que el AMP cíclico inhibe la proliferación celular a través de distintos mecanismos, uno de ellos es, precisamente, la inhibición de la señal de calcio. En el presente trabajo se estudió el efecto de fármacos estimuladores e inhibidores de adenilato ciclasa y proteína cinasa A (PKA), sobre las dos fases de la señal de calcio en linfocitos humanos, a saber, vaciamiento de reservorios y entrada capacitativa. Los estudios fueron llevados a cabo mediante el uso del indicador fluorescente Fura2-AM. Se observó que cualquier desviación del nivel basal de actividad de PKA inhibió la entrada capacitativa, mientras que la activación de adenilato ciclasa con forskolina redujo el vaciamiento de reservorios sensibles a thapsigargina a través de un mecanismo independiente del inhibidor H-89.

## Introducción

El  $Ca^{2+}$  y el AMP cíclico (AMPc) son segundos mensajeros que regulan un gran número de procesos celulares. En linfocitos humanos la señal de  $Ca^{2+}$  se produce en respuesta a estímulos que actúan a través del receptor antigénico de células B y T. Cuando un antígeno es reconocido por estos receptores se activan tirosina quinasas intracelulares, de la familia src, que activan la enzima fosfolipasa C $\alpha$ , la cual se transloca a la membrana plasmática y a su vez produce dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$ ). El IP $_3$  inicia la señal intracelular de  $Ca^{2+}$  al unirse al receptor de IP $_3$ , que es al mismo

tiempo un canal de  $Ca^{2+}$  localizado en el retículo endoplasmático por el que se libera este ion de los reservorios intracelulares. La liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios del retículo endoplasmático induce, a través de un mecanismo aún desconocido, la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el exterior celular, a través de canales poco caracterizados a nivel molecular; esta entrada de  $Ca^{2+}$  recibe el nombre de "entrada capacitativa" (Putney, 1990).

Desde principios de la década de 1980, diversos autores (Tsien, 1982; Jayaraman, 1995) han reconocido la importancia de la señal intracelular de  $Ca^{2+}$  como un paso crucial en la cascada de eventos intracelulares que dan lugar a la proliferación de linfocitos T y B en respuesta a un estímulo inmunológico. La mayoría de estos estudios utilizan sin embargo, estímulos no inmunológicos para inducir la señal de calcio, los más importantes son el uso de lectinas mitogénicas que producen las mismas señales intracelulares que la unión de un antígeno, así como ionóforos de  $Ca^{2+}$  e inhibidores de la  $Ca^{2+}$  ATPasa del retículo endoplasmático, que inducen un vaciamiento de reservorios intracelulares en ausencia de producción de IP $_3$ . Otros estudios han sugerido que existe más de una ruta de entrada de  $Ca^{2+}$  en linfocitos T y B (Guse, 1998).

Por otro lado, la concentración intracelular de AMPc ([AMPc]<sub>i</sub>) depende de las actividades de al menos dos tipos de enzimas: la adenilato ciclasa (AC) y las fosfodiesterasas. A su vez, casi todos los efectos celulares inducidos por un aumento de la [AMPc]<sub>i</sub> son dependientes de la serina/treonina cinasa PKA (cinasa dependiente del AMPc). Las señales intracelulares mediadas por AMPc se correlacionan casi siempre con una reducción de la respuesta inmune. Se ha descrito que un aumento en la concentración intracelular de AMPc ([AMPc]<sub>i</sub>) inhibe la proliferación celular de linfocitos T inducida por el anticuerpo OKT3, a través de un mecanismo dependiente de la inhibición de la señal de  $Ca^{2+}$  (Rothman, 1993); otros autores han encontrado resultados similares en linfocitos de sangre periférica activados con lectinas mitogénicas (van Tits, 1991). Es decir, el AMPc y el  $Ca^{2+}$  provo-

\* Estos resultados ya han sido publicados como parte del artículo "Modulation of thapsigargin-induced calcium mobilization by cAMP-elevating agents in human lymphocytes is insensitive to the protein kinase A inhibitor H-89, Cell. Signal". 2001, 13, 441 y en la tesis doctoral de la autora.

\*\* Departamento de Ciencias Básicas, Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, México.

can respuestas celulares inversas.

En este trabajo se estudió la manera en que los niveles de  $[AMPC]_i$  pueden regular a la señal intracelular de  $Ca^{2+}$  desencadenada por el vaciamiento de reservorios intracelulares, es decir entrada capacitativa. Se utilizó como estímulo a la Tg, un potente inhibidor de la  $Ca^{2+}$  ATPasa del retículo endoplasmático, por tratarse de un fármaco que actúa directamente sobre los mecanismos de regulación de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ), sin involucrar ningún otro sistema de transducción de señal.

## Materiales y métodos

### A) Reactivos y medios

Para la purificación de los linfocitos se utilizó Percoll® de Pharmacia (España). Para la determinación de la  $[Ca^{2+}]_i$  se usó el indicador fluorescente Fura2-AM de Molecular Probes (Holanda). Los reactivos taspigargina (Tg), forskolina (FSK), SQ22,536 y H-89 se obtuvieron de la casa comercial Alexis (Suiza) y el dibutilil AMP cíclico (dbcAMP) de Sigma (USA). Las demás sales y reactivos provinieron de diversas casas comerciales, siendo todos ellos de la mayor pureza existente. El medio empleado para la purificación de linfocitos fue PBS + EDTA, que contiene: NaCl, 137 mM;  $Na_2HPO_4$ , 8.2 mM;  $KH_2PO_4$ , 1.5 mM; KCl, 3.2 mM y EDTA, 2 mM. Las determinaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  se llevaron a cabo en medio Umbreit, con la siguiente composición iónica:  $Na^+$ , 142.3 mM;  $K^+$ , 5.94 mM;  $Ca^{2+}$ , 1 mM;  $Mg^{2+}$ , 1.2 mM;  $Cl^-$ , 126.1 mM;  $HCO_3^-$ , 22.85 mM;  $PO_4H^{2-}$ , 1.2 mM y  $SO_4^{2-}$ , 12 mM; glucosa 1mg/ml.

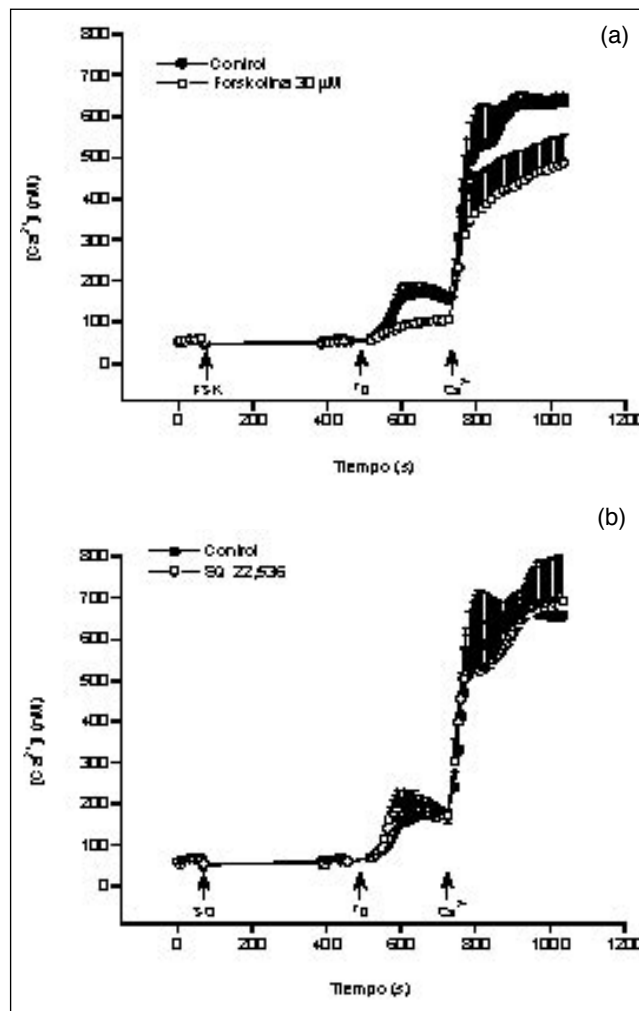
### B) Purificación de linfocitos

Los linfocitos fueron obtenidos de sangre recién extraída de donantes sanos, proporcionada por el Banco de Sangre de Galicia, a través del Servicio de Hematología del Hospital General de Lugo.

Los linfocitos se purificaron por el método de centrifugación sobre Percoll® al 57.5%. La sangre fue diluida a razón 1:1 con PBS+EDTA y 4 mL de sangre se colocaron cuidadosamente sobre 3 mL de Percoll® en tubos de polietileno de 10 mL de capacidad. Se centrifugó a temperatura ambiente, a 1,000 g durante 25 minutos. Tras la centrifugación, los linfocitos se extrajeron con una pipeta Pasteur de la superficie del Percoll® y se lavaron 2 veces a 600 g durante 8 minutos. Las células purificadas se contaron mediante un contador de células sanguíneas modelo System 9000 Coulter Counter (Menarini Diagnóstico, España) y la pureza fue siempre superior al 80%.

### C) Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ con Fura2-AM

**CARGA DEL INDICADOR:** Se realizó mediante la incubación de células durante 10 minutos, a 37°C con 2-3  $\mu$ M de Fura2-AM; a continuación se realizaron dos lavados.



**Figura 1.** Efecto de la modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) sobre el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por Tg en linfocitos humanos. Los fármacos moduladores de la adenilato ciclasa a) forskolina y b) SQ22,536, se añadieron a linfocitos bañados por un medio sin  $Ca^{2+}$ ; después de 5 minutos se agregó Tg 0,5 mM y por último  $CaCl_2$  1 mM. El control, en ambos casos, muestra el efecto de la Tg. Promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos.

**MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA Y DETERMINACIÓN DE  $[Ca^{2+}]_i$ :** El sistema de medición de fluorescencia consistió en un microscopio invertido Nikon Diaphot 200, equipado con un objetivo de inmersión 40X para fluorescencia. Como fuente de luz utiliza una lámpara de xenón de 100 W conectada a una rueda de filtros de excitación Rainbow de ocho posiciones (Life Science Resources, Reino Unido). Una vez cargadas con el indicador, las células fueron adheridas a

un cubreobjetos previamente tratado con polilisina al 0.001% y este fue montado en un soporte que sirve para contener un volumen de hasta 1 ml de medio, que, a su vez, fue colocado dentro de una cámara que mantiene la temperatura a 37°C. La medición de la intensidad de fluorescencia se realizó a dos longitudes de onda de excitación, 340 y 380 nm, y una de emisión, 520 nm. La  $[Ca^{2+}]_i$  se obtuvo a partir del cociente de intensidades a longitud de onda de excitación 340/380, de acuerdo al método propuesto por Grynkiewicz (Grynkiewicz, 1985). Para realizar la calibración,  $R_{max}$  se obtuvo mediante la adición de ionomicina 10 mM a células en un medio con calcio, a continuación se agregó el quelante EGTA (en una disolución en  $H_2O$  de una mezcla EGTA:TRIS 1:3) hasta que la relación 340/380 llegó al mínimo ( $R_{min}$ ).

#### D) Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por duplicado. Los resultados están expresados como media  $\pm$  SEM. Cuando se indica, los resultados fueron analizados mediante una prueba T de student para datos dependientes, tomando como significativo un valor de  $P < 0.05$ .

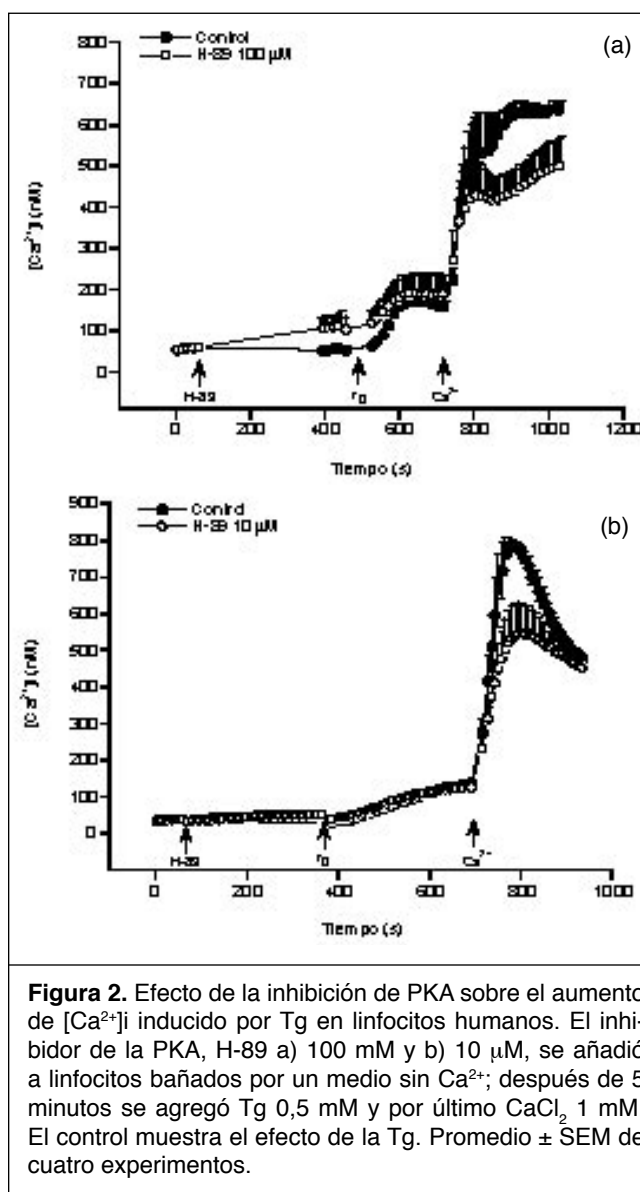
### Resultados

En la Figura 1 se observa el efecto de fármacos que modifican la actividad de la adenilato ciclasa (AC), y por tanto, los niveles de  $[AMPc]_i$ , sobre los cambios de  $[Ca^{2+}]_i$  originados por Tg. En un medio sin  $Ca^{2+}$ , la Tg produce un vaciamiento de reservorios que, al añadir  $Ca^{2+}$  al medio extracelular, provoca una gran entrada capacitativa; la preincubación con FSK 30 mM produjo una inhibición tanto del vaciamiento de reservorios, como de la entrada capacitativa. Por el contrario, el inhibidor de la AC SQ22,536, no tuvo efectos sobre ninguna de las dos fases de la señal de  $Ca^{2+}$ .

En la Figura 2 se observa el efecto de la inhibición de la PKA, el siguiente paso en el sistema de transducción de señales dependientes del AMPc, sobre la señal de  $Ca^{2+}$  generada por Tg. En ella se observa que la inhibición de la PKA con H-89 produjo a su vez, una inhibición de la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por Tg. Además, una alta concentración de H-89 (100 mM) provocó un vaciamiento de reservorios de  $Ca^{2+}$  (2a).

Estos resultados indican que tanto la activación (FSK) como la inhibición (H-89) de la PKA reducen la entrada de  $Ca^{2+}$  producida por Tg en linfocitos humanos sugiriendo que esta cinasa juega un papel importante en la modulación de la entrada capacitativa de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, este no puede ser el único mecanismo que acopla los reservorios intracelulares con los canales de entrada de  $Ca^{2+}$ , ya que en ningún caso la inhibición de la entrada de  $Ca^{2+}$  es completa, por lo que la PKA sólo actuaría como un mecanismo regulador.

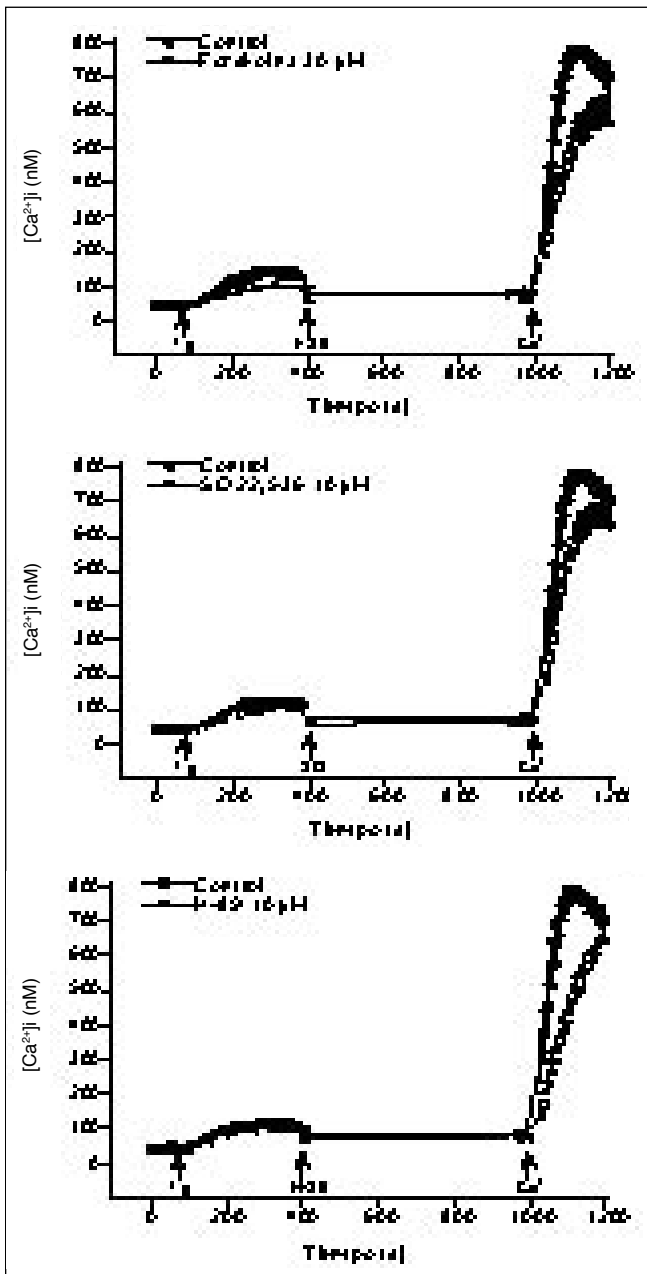
Además, debemos tomar en cuenta que la activación de la PKA, con forskolina, produce no sólo una inhibición de la entrada capacitativa, sino que también inhibe el vaciamiento de reservorios, por lo tanto, es posible que la entrada de  $Ca^{2+}$  sea menor a causa del



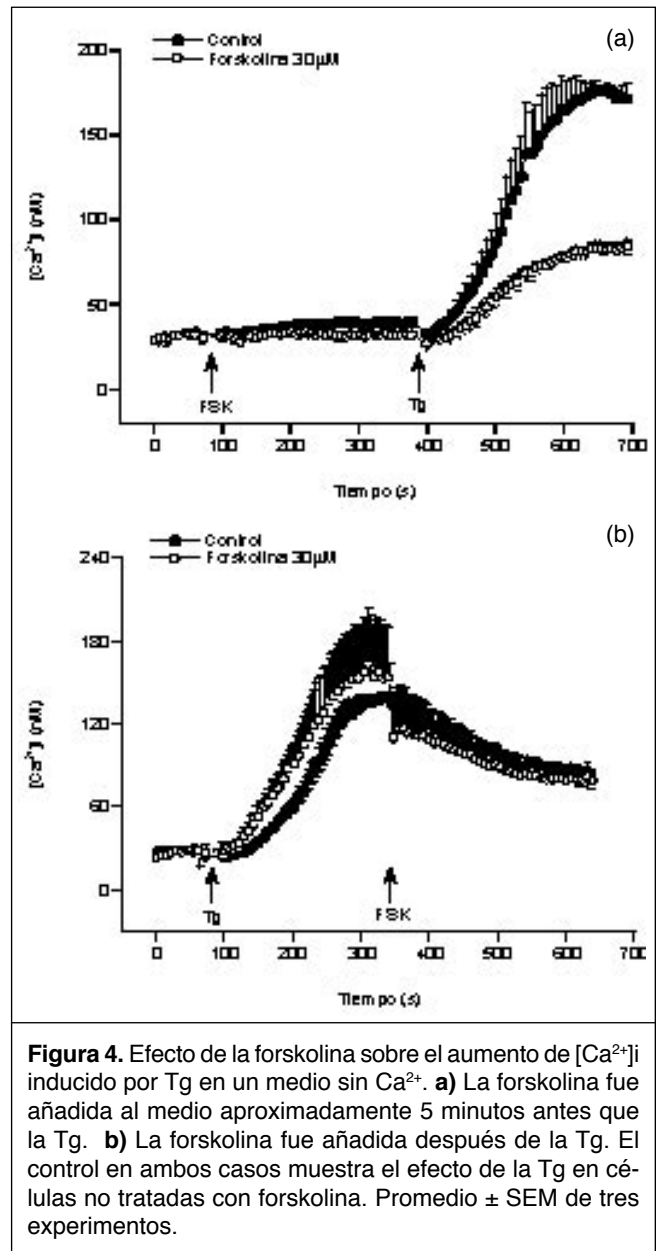
**Figura 2.** Efecto de la inhibición de PKA sobre el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por Tg en linfocitos humanos. El inhibidor de la PKA, H-89 a) 100  $\mu$ M y b) 10  $\mu$ M, se añadió a linfocitos bañados por un medio sin  $Ca^{2+}$ ; después de 5 minutos se agregó Tg 0,5 mM y por último  $CaCl_2$  1 mM. El control muestra el efecto de la Tg. Promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos.

menor vaciamiento de reservorios. Para comprobarlo se utilizaron los mismos fármacos: forskolina, SQ22,536 y H-89 para manipular la ruta del AMPc/PKA, después de vaciar los reservorios de  $Ca^{2+}$  con Tg en un medio sin este ion; de este modo se asegura que el vaciamiento de reservorios es el mismo en todas las condiciones experimentales y por lo tanto se puede estudiar el efecto de la actividad de la PKA exclusivamente sobre la entrada capacitativa de  $Ca^{2+}$ .

En la Figura 3 se observa, una vez más, que tanto la inhibición (3 b y c) como la estimulación (3a) de la PKA disminuyó la entrada de  $Ca^{2+}$  producida por Tg cuando el vaciamiento de reservorios intracelulares se mantuvo constante.



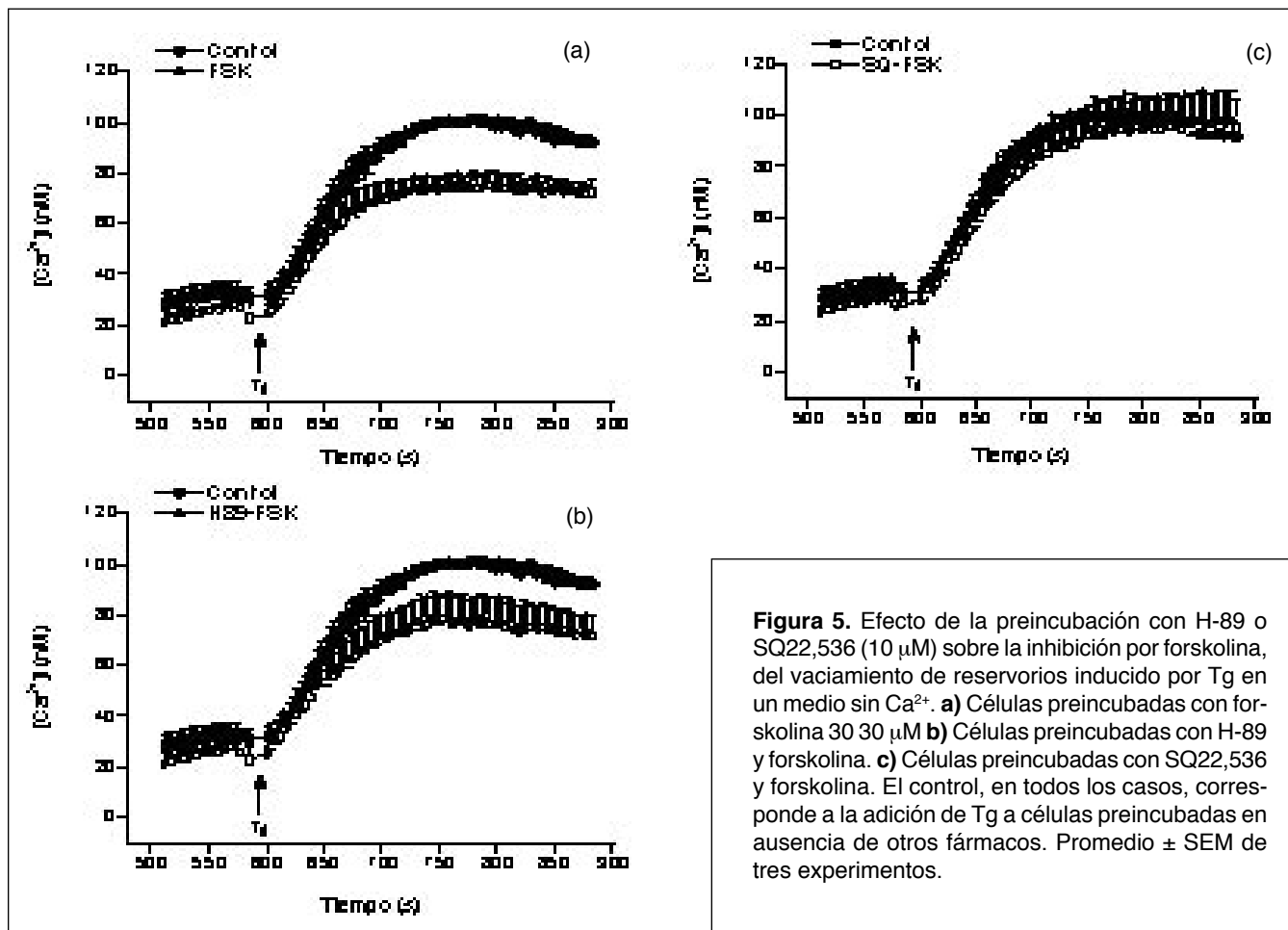
**Figura 3.** Efecto de la modificación de la  $[AMPc]_i$  y de la actividad de la PKA, sobre la entrada de  $Ca^{2+}$  en linfocitos humanos tratados con Tg  $0,5 \mu M$ . Se añadió Tg a linfocitos bañados por un medio sin  $Ca^{2+}$ , a continuación se agregaron los fármacos a) forskolina b) SQ22,536 y c) H-89; tras 10 minutos de incubación en el medio sin  $Ca^{2+}$  este fue sustituido por un medio con dicho ion. El control es siempre la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por Tg en ausencia de otros fármacos. Promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos.



**Figura 4.** Efecto de la forskolina sobre el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por Tg en un medio sin  $Ca^{2+}$ . **a)** La forskolina fue añadida al medio aproximadamente 5 minutos antes que la Tg. **b)** La forskolina fue añadida después de la Tg. El control en ambos casos muestra el efecto de la Tg en células no tratadas con forskolina. Promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos.

Otro efecto interesante observado en este trabajo, es la inhibición por FSK del vaciamiento de reservorios inducido por Tg. En la Figura 4 se confirma que en un medio sin  $Ca^{2+}$ , la FSK inhibe el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  producido por Tg, que es debido exclusivamente al vaciamiento de reservorios. Por otro lado, la adición de forskolina a células tratadas con Tg, siempre en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, produce una ligera caída inmediata de la  $[Ca^{2+}]_i$ , aunque los niveles finales de  $[Ca^{2+}]_i$  son iguales a los del control





(células tratadas únicamente con Tg).

Esto sugiere que la forskolina puede movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol, hacia reservorios insensibles a la Tg (probablemente mitocondrias) aunque esta movilización no es muy eficaz para retirar todo el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico liberado de los reservorios sensibles a Tg.

Por último, se decidió comprobar que el efecto de forskolina sobre el vaciamiento de reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por Tg fuera en realidad dependiente de la elevación del  $[\text{AMPc}]_i$  y por consiguiente de la activación de la PKA; ya que se han descrito efectos inespecíficos de este fármaco en linfocitos (Choudhry, 1999). En la Figura 5 se muestra el efecto de la adición de Tg sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de linfocitos preincubados en presencia o ausencia de forskolina (5a), H-89 y forskolina (5b) o SQ22,536 y forskolina (5c). Las concentraciones usadas para cada fármaco fueron: forskolina 30  $\mu$ M, H-89 y SQ 10  $\mu$ M.

En esta figura se observa que la combinación SQ22,536-forskolina bloqueó el efecto de la forskolina sobre el vaciamiento de reservorios inducido por Tg (5c); por el contrario, la utilización de H-89 no inhibe el efecto de la forskolina (5b). Estos resultados son inesperados, ya que sugieren que el efecto de la forskolina es dependiente de la activación de AC, y por lo tanto de una elevación de la  $[\text{AMPc}]_i$  pero independiente de la activación de PKA.

En conclusión, el presente trabajo indica que tanto la activación como la inhibición de PKA reduce la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  en linfocitos humanos, lo cual sugiere que PKA es un mecanismo de regulación fina de este proceso. Por otro lado, la activación de AC con FSK reduce también la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de reservorios sensibles a Tg a través de un mecanismo dependiente de la producción de AMPc, pero independiente de la activación de PKA.

## REFERENCIAS

- Choudhry, M. A., Z. Ahmed, y M. M. "Sayeed. PGE(2)-mediated inhibition of T cell p59(fyn) is independent of cAMP". *Am. J. Physiol.* 277: C302-9, 1999.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, y R. Y. Tsien. "A new generation of Ca<sup>++</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties". *J. Biol. Chem.* 260: 3440-50, 1985.
- Guse, A. H., E. Roth, y F. Emmrich. "Intracellular Ca<sup>2+</sup> pools in Jurkat T-lymphocytes". *Biochem J.* 291: 447-51, 1993.
- Jayaraman, T., E. Ondriasková, K. Ondrias, D. Harnick, y A. Marks. "The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signalling". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6007-11, 1995.
- Putney, J. W. "Capacitative calcium entry revisited". *Cell Calcium* 11: 611-24, 1990.
- Rothman, B. L., N. Kennure, K. A. Kelley, M. Katz, y T. M. Aune. "Elevation of intracellular cAMP in human T lymphocytes by an Anti-CD44 mAb". *J. Immunol* 151: 6036-42, 1993.
- Tsien, R.Y., T. Pozzan y T. J. Rink. "T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> and membrane potential in lymphocytes". *Nature* 295:68-70, 1982.
- Van Tits, L. J. H., M. C. Michel, H. J. Motulsky, A. S. Maisel, y O. E. Brodde. "Cyclic AMP counteracts mitogen-induced inositol phosphate generation and increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in human lymphocytes". *Br. J. Pharmacol.* 103: 1288-94, 1991.

# *Nanopartículas metálicas y semiconductoras en dispersiones coloidales*

David Díaz\*

El principal objetivo de este trabajo es presentar una ruta general de síntesis novedosa y directa de nanopartículas metálicas y semiconductoras (óxidos y sulfuros de metales de transición) en dispersión coloidal. El medio de dispersión en el que se encuentran las nanopartículas es un disolvente aprótico y polar como el DMSO. La basicidad del disolvente desempeña un rol importante en el curso de la reacción de síntesis. Como materiales de partida se usan carboxilatos metálicos. En la caracterización de las dispersiones coloidales se han utilizado las espectroscopias de absorción y emisión electrónicas, en la región UV-visible, la  $^1\text{HNMR}$ , FTIR en la región lejana y la difracción de rayos X en polvo. La microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM) ha permitido determinar que el tamaño promedio de las nanopartículas está entre 2 y 7 nm, con distribuciones de tamaño muy estrechas.

## Introducción

En esta conferencia se presentarán algunos de los principales resultados experimentales y teóricos obtenidos por mi grupo de trabajo y colaboradores, nacionales y extranjeros. Una de nuestras tareas principales es la preparación de dispersiones coloidales estables que contienen nanopartículas de materiales metálicos y semiconductores. La obtención de nanopartículas la realizamos mediante rutas de síntesis simples, propias, reproducibles y novedosas, en condiciones de reacción suaves. Se busca preparar nanopartículas con diámetros comprendidos entre 1 y 7 nm y con distribuciones de tamaños unimodales y muy estrechas. Los informes publicados en la literatura especializada, y nuestra experiencia, nos indican que las nanopartículas semiconductoras y metálicas de estas dimensiones manifiestan los efectos cuánticos de manera más pronunciada. Entre los materiales semiconducto-

res que hemos estudiado están la plata, algunos sulfuros y óxidos binarios metálicos como los siguientes:  $\text{CdS}$ ,  $\text{RuS}_2$ ,  $\text{In}_2\text{S}_3$ ,  $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ,  $\text{FeS}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CuO}$ ,  $\text{Cu}_2\text{O}$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

El medio en el que se encuentran dispersas las nanopartículas que preparamos, siempre es un disolvente orgánico polar. En particular, el dimetilsulfóxido (DMSO) ha resultado ser un disolvente ideal para este fin, ya que muchas sales metálicas se solubilizan en bajas concentraciones, así como algunos compuestos orgánicos que se usan como modificadores de las superficies de las nanopartículas (capping agents).

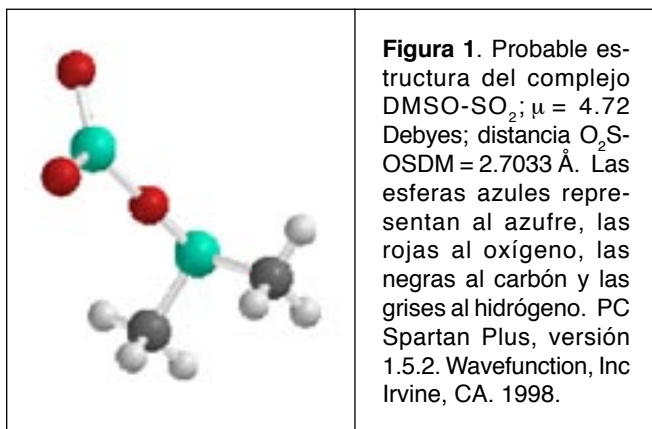
Las dispersiones coloidales resultantes que contienen DMSO tienen carácter liófilico (afinidad por la fase dispersada). La liofilia de estos coloides ayuda a incrementar su estabilidad durante meses, e incluso años. También, hemos usado con éxito, la  $\text{N,N}'$ -dimetilformamida (DMF), acetonitrilo, etanol y metanol. Se ha evitado el uso de disolventes orgánicos clorados.

Considero pertinente indicar que el dimetilsulfóxido es un líquido a temperatura ambiente, proviene de la madera, se considera que tiene una toxicidad muy baja, es incoloro, aprótico y polar. También, vale la pena mencionar que es un disolvente de bajo costo.

La molécula de DMSO tiene una estructura piramidal, con los átomos de azufre, oxígeno y carbonos en los extremos. El valor promedio de la longitud del enlace S-O, cuando el DMSO está solvatado en  $\text{H}_2\text{O}$ , es de 1.495 Å. El DMSO es una especie muy polar (4.30 D) y además, este compuesto tiene una constante dieléctrica suficientemente alta (46.70), lo que facilita la separación de cargas y favorece la solubilidad de sólidos iónicos, compuestos polares y en general especies polarizables. El DMSO ya se utiliza en procesos de refinación de la industria petrolera, representando una fuente de azufre segura (Fig. 1).

Una vez que se han preparado las dispersiones coloidales estables de cada material procedemos a completar la caracterización de las mismas. Usamos como herramientas espectrales de rutina, las espectroscopias de absorción y emisión electrónicas, en la región UV-visible. Cuando la naturaleza de las dispersiones lo

\* Facultad de Química, UNAM. Edificio B, Coyoacán 04510, México, D. F., Correo electrónico: david@servidor.unam.mx

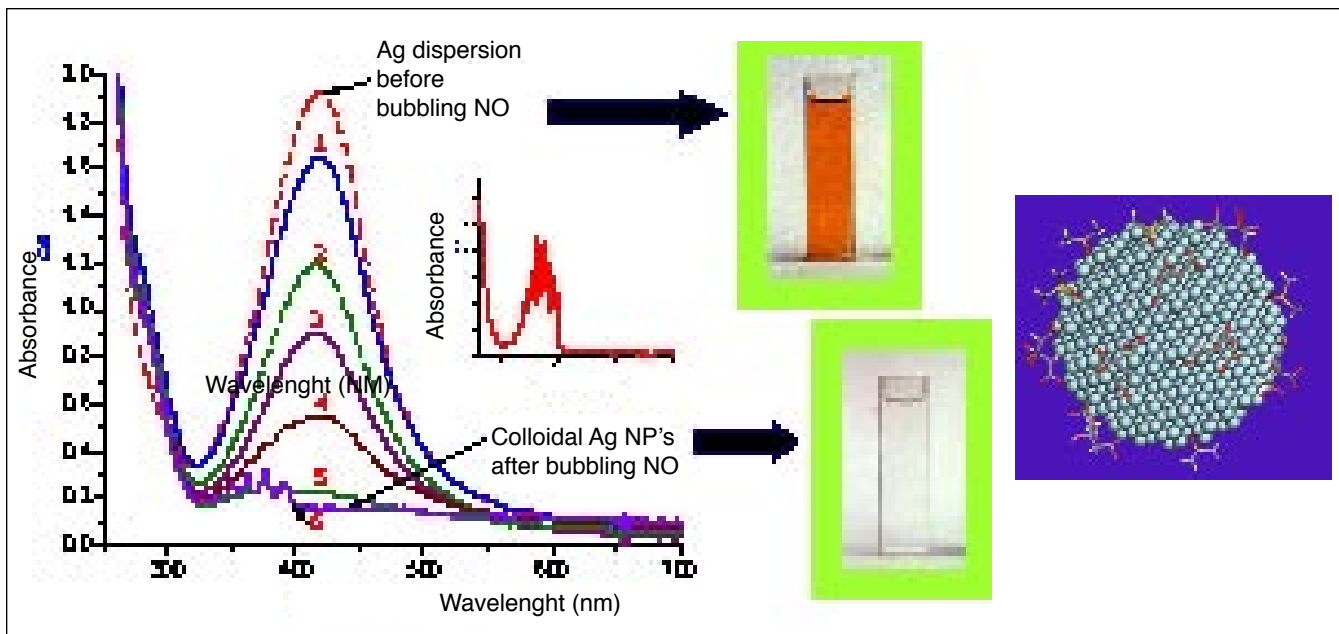


permite, se aplican las espectroscopías <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR y EPR. Igualmente usamos la difracción de rayos X (XRD), en su variante de polvos. Una parte fundamental en la caracterización de las nanopartículas la constituye la microscopía de transmisión electrónica de gran resolución (HR-TEM). También, hemos utilizado la espectroscopía vibracional de infrarrojo, en las regiones normal y lejana, la microscopía electrónica de barrido (SEM), así como la de fuerza atómica (AFM) en modo de contacto intermitente y la voltamperometría cíclica.

La siguiente etapa comienza cuando ya se han recolectado algunos resultados espectrales; entonces se procede a interpretarlos en función de las propiedades electrónicas de las especies involucradas. Para alcanzar este fin hemos creado algunos modelos estructurales sencillos, a los que se les han realizado cálculos de mecánica cuántica, usando métodos semiempíricos y/o ab initio. En algunas ocasiones se usa la teoría de funcionales de la densidad (DFT). Estos estudios teóricos se realizan en colaboración estrecha con el grupo de Química Teórica de la Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato, que dirige el doctor Juvencio Robles García.

Simultáneamente, hemos procurado encontrar aplicaciones para las dispersiones coloidales que se han caracterizado completamente. En particular, hemos dirigido nuestros esfuerzos hacia la catálisis y a la destrucción de compuestos orgánicos persistentes (Fig. 2). Donde hemos tenido más éxito ha sido en la reducción de NO a N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O (en trazas) usando nanopartículas de plata (en coloide y depositadas sobre ZrO<sub>2</sub> en polvo).

Evidentemente no están descartadas otras aplicaciones como son los dispositivos magnéticos de almacenamiento de datos o aquellas en donde las propiedades fluorescentes de las nanopartículas se puedan aprovechar. Por lo tanto, las aplicaciones potenciales las nanopartículas semiconductoras y metálicas son múltiples y variadas.



**Figura 2.** Cambios espectrales de una dispersión coloidal de plata en DMSO anhidro. En la parte superior se muestra a la dispersión de plata inicial y en la parte inferior aparece la misma dispersión después de interactuar con varias porciones de NO. A la derecha hay una representación de una nanopartícula de plata (Rodríguez-Gattorno et al., 2002).

### Conceptos básicos

Las nanopartículas también conocidas como partículas de tamaño cuántico o partículas ultrafinas, son cúmulos de átomos o moléculas con diámetros entre 10 y 1000 Å. Las propiedades ópticas, electrónicas y catalíticas de las partículas ultrafinas difieren drásticamente de las correspondientes a sustancias macrocristalinas que tienen la misma composición química.

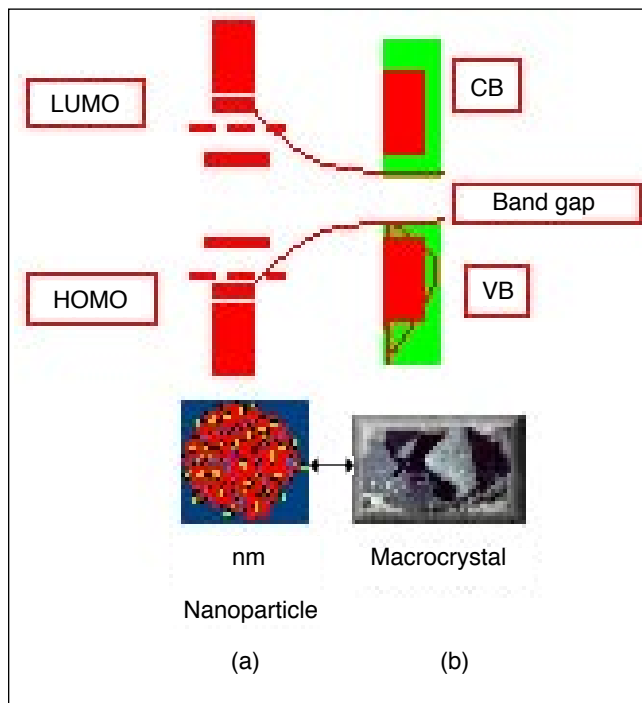
Durante la década pasada, el estudio de los materiales con partículas, con dimensiones tan pequeñas como los nanómetros, ha tenido un gran desarrollo en diferentes campos de la ciencia. En los materiales semiconductores, por ejemplo, la diferencia de energía entre la banda de valencia y la de conducción ( $E_g$ ) cambia con el tamaño de la partícula; a medida que éste disminuye, el valor de la energía de brecha prohibida se incrementa (Fig. 3). En especial, esta propiedad ha sido estudiada para diseñar nuevos materiales con aplicaciones en electrónica. De igual manera, las propiedades catalíticas de estas partículas están siendo estudiadas, para ser usadas en síntesis orgánica y en procesos de control de emisiones contaminantes del medio ambiente.

Algo que llama la atención de las nanopartículas es la diferencia en propiedades con respecto a las de los macrocristales. La razón de este comportamiento puede reducirse a dos fenómenos: el primero es la gran dispersión de los sistemas nanocristalinos, es decir, el número de átomos en la superficie de los nanocúmulos es comparable, o mayor que el número de átomos localizados en el interior de los mismos (Fig. 4). Las propiedades físicas y químicas, que son generalmente determinadas por la estructura del macrocristal, empiezan a ser dominadas por los defectos de superficie en los nanocristales.

El segundo fenómeno ocurre únicamente con nanopartículas de semiconductores y metales. La longitud de onda de De Broglie asociada a los electrones (y los huecos correspondientes) se vuelve comparable al tamaño del cristal. Bajo estas condiciones, los acreedores de carga en los nanocristales semiconductores pueden ser tratados de acuerdo a la mecánica cuántica como partículas en una caja de potencial, en donde el tamaño de la caja está determinado por las dimensiones del cristal. En este estado, las bandas de valencia (BV) y de conducción (BC) se desdoblan en niveles electrónicos discretos y la diferencia de energía entre BV y BC aumenta a medida que disminuye el tamaño de la partícula.

### Resultados

En esta conferencia se revisarán algunos resultados que se han obtenido en mi grupo de trabajo, concernientes a nanopartículas de CdS modificadas superficialmente con moléculas de 2-etilhexanoato (CdS-ethex) y otras modificadas con iones  $[\text{MoS}_4]^{2-}$  (CdS-MoS<sub>4</sub>) (véase la Fig. 5). Posteriormente se mostrarán los principales resultados de los coloides de plata, así como los relativos a la reducción del óxido nítrico. En la tercera parte se presentarán resultados de nanopartículas de ZnO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y CuO.



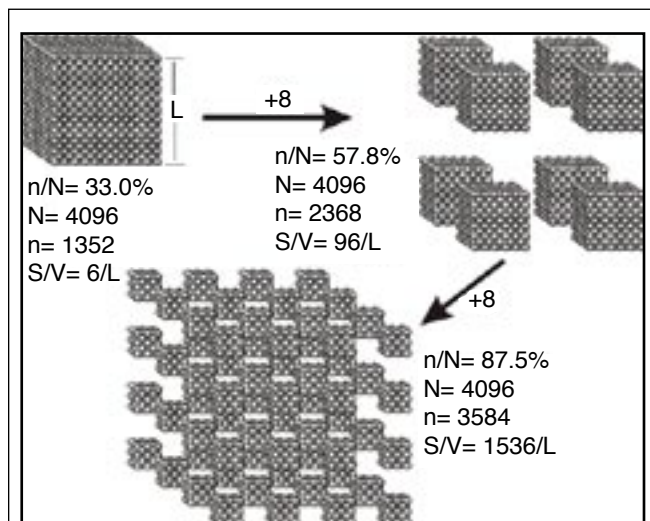
**Figura 3.** Diagrama de desdoblamiento de niveles energéticos de orbitales moleculares correspondiente a un material semiconductor. (a) Para una nanopartícula; en este caso aparecen los orbitales frontera, HOMO y LUMO. (b) Para un microcristal; aquí se muestran las bandas de valencia (VB) y la de conducción (CB), así como la energía de brecha prohibida (band gap).

A continuación se presenta una muestra de esos resultados experimentales.

La mejor técnica para preparar nanopartículas es a través de la formación de dispersiones coloidales, por este método se obtienen nanopartículas con un tamaño menor a los 100 nm. Las partículas son tan pequeñas que la acción de la gravedad sobre ellas resulta despreciable. Su característica fundamental es que hay un área de contacto muy grande entre las partículas dispersas y el medio de dispersión.

Los métodos de síntesis coloidales son muy reproducibles y la formación de dispersiones diluidas permite controlar las dimensiones del cúmulo formado (Esquema 1). De esta manera se puede tener acceso a una gran variedad de materiales, gracias al manejo fácil de los coloides.

En el contexto determinado por nuestras líneas de investigación, hemos iniciado la experimentación que involucra a las nanopartículas de plata coloidal, generadas in situ y depositadas sobre óxidos metálicos en polvo, inicialmente suspendidos en DMSO, para



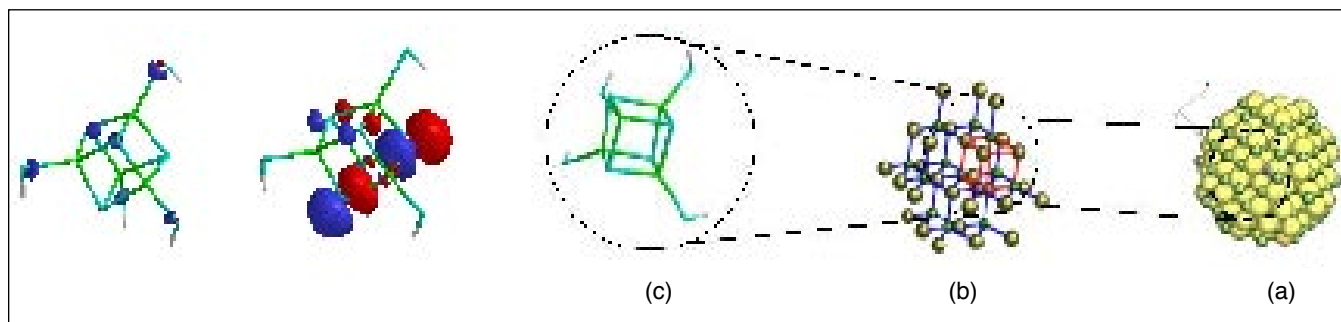
**Figura 4.** Variación del número de átomos o moléculas superficiales versus tamaño de partícula.  $N$  = número total de átomos,  $n$  = número total de átomos superficiales.

reducir a las moléculas de óxido nítrico (el gas precursor de la contaminación atmosférica debida a los  $\text{NO}_x$ ). En particular, cuando se usa al óxido de zirconio ( $\text{ZrO}_2$ , en su fase monoclinica) como sustrato sólido y se hace reaccionar con una mezcla de óxidos de nitrógeno, en presencia de propano, se logra una excelente conversión, tomando en cuenta que el porcentaje de plata en el catalizador es de 0.1%. (Fig. 6).

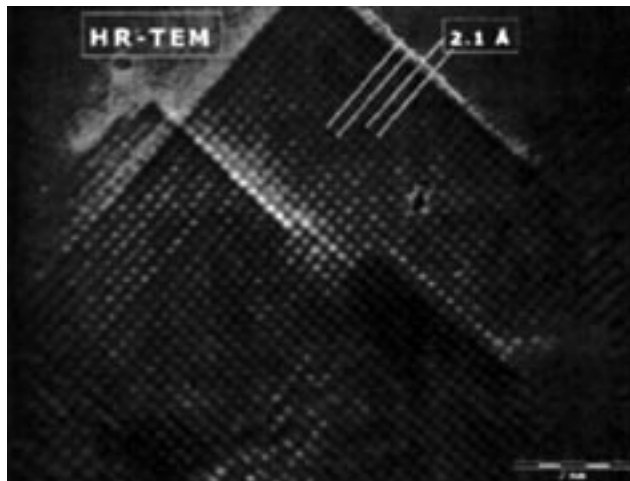
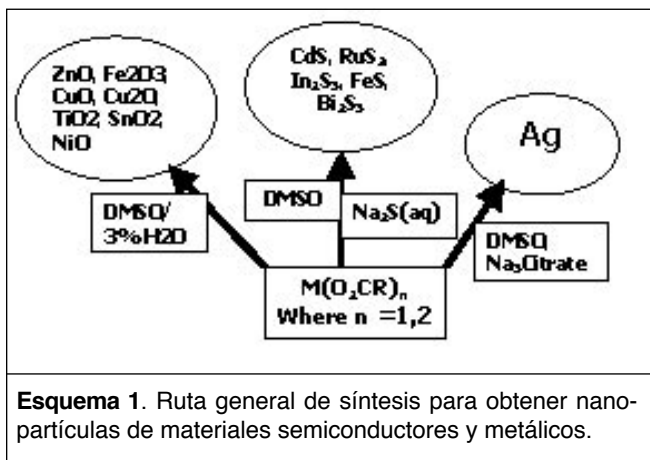
Debido a que la magnetita se aplica en varias áreas tecnológicas como son: a) el diseño de dispositivos electromagnéticos para el almacenamiento de información, b) la catálisis, c) la fabricación de pigmentos rojos,

d) agentes anticorrosivos, e) sensores de gases ( $\text{NO}_x$ ) y f) la conversión de energía solar; decidimos preparar dispersiones coloidales estables de nanopartículas ultrafinas hechas a base de este semiconductor.

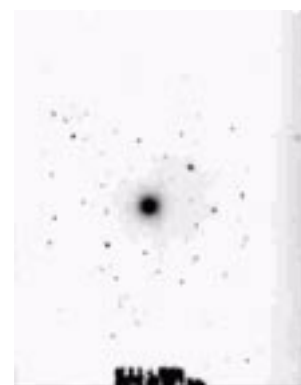
Dentro de los ocho diferentes óxidos de hierro presentes en la naturaleza, destacan por sus propiedades y aplicaciones la magnetita (fase cúbica centrada en las caras, ccc) y la maghemita (fases ccc, o tetragonal). La magnetita es un semiconductor que presenta dos tipos de comportamiento p y n; mientras que la maghemita es del tipo n. En la Figura 7, se muestra una parte de la caracterización de las dispersiones coloidales de magnetita preparadas en nuestro laboratorio.



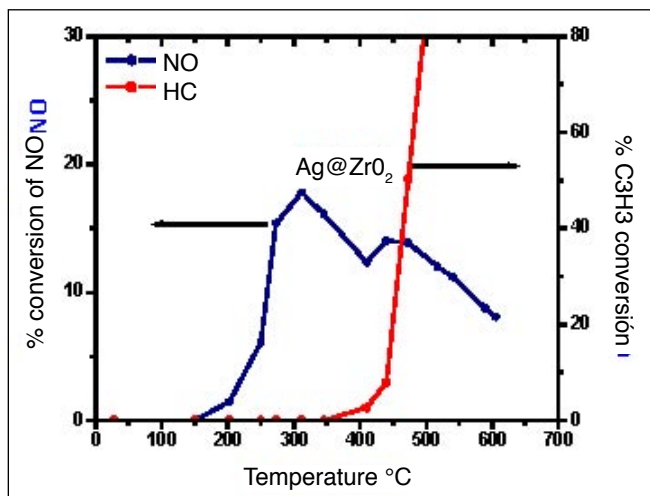
**Figura 5.** (a) Modelo estructural de una nanopartícula de CdS con diámetro promedio de 2.2 nm. Estos nanocúmulos están formados por aproximadamente 278 átomos. El número aproximado de átomos ubicados en la superficie de estas nanopartículas es 208. Por consiguiente, el 75% del total de los átomos forman la superficie de estas nanopartículas de CdS. (b) La mayor parte de las nanopartículas CdS tienen una malla cristalina de blenda de zinc (aunque la fase hexagonal también está presente en condiciones normales de reacción) y en sus superficies se pueden observar muchas estructuras pseudocúbicas (trazadas en rojo). (c) Por lo tanto, el anterior cúmulo parece ser un buen modelo mecánico cuántico que representa un trozo pequeño de la superficie de estas nanopartículas de CdS. También, se muestran los orbitales frontera del cúmulo  $[(\text{SH})_4\text{Cd}_4(\mu_3\text{-S})_4]^{-4}$  y su dureza electrónica 8.6735 eV (Vázquez Olmos et al., 2003).



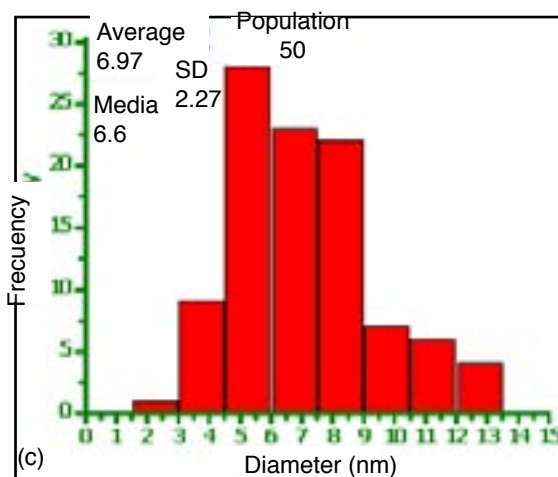
(a)



(b)



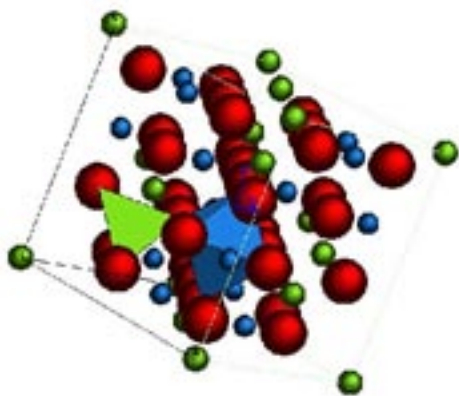
**Figura 6.** Gráfica de porcentaje de conversión de óxido nítrico y de propano versus temperatura, en presencia de plata nanoestructurada depositada sobre óxido de zirconio en polvo (Rodríguez-Gattorno et al., datos sin publicar).



(c)

**Figura 7.** (a) Fotografía de HR-TEM correspondiente a una muestra de  $Fe_3O_4$ . (b) Patrón de difracción electrónica de un nanocrystalito de magnetita. (c) Histograma de distribuciones de tamaño de nanopartículas de  $Fe_3O_4$ .





En la estructura cúbica centrada en la cara (ccp) de la magnetita, los átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  ocupan los intersticios tetraédricos, los cuales pueden verse parcialmente reemplazados por otros cationes trivalentes del mismo tamaño como son  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{V}^{3+}$ . Otros cationes como  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{4+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  también pueden ser incorporados a la estructura del óxido.

En la estructura cúbica, una tercera parte de los intersticios totales se encuentran tetraédricamente coordinados con oxígeno y dos terceras partes lo están octaédricamente. La magnetita tiene una estructura de espinela inversa, en donde las posiciones tetraédricas están completamente ocupadas por iones  $\text{Fe}^{3+}$ , las posiciones octaédricas se encuentran totalmente ocupadas por cantidades iguales de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ .

## Conclusiones

En el presente se cuenta con una ruta general de síntesis de nanopartículas de plata y óxidos y sulfuros binarios metálicos. Esta ruta es sencilla, reproducible, novedosa y no requiere de instrumentación complicada y costosa. Cualquier estudiante de química, de nivel licenciatura, puede preparar nanopartículas ultrafinas, con distribuciones de tamaños estrechas, utilizando nuestra metodología. También, contamos con los recursos necesarios para hacer una caracterización bastante completa de las dispersiones coloidales que contienen nanopartículas metálicas y semiconductoras. Igualmente, hemos conformado un equipo de trabajo multidisciplinario que permite hacer interpretaciones de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, en función de sus estructuras electrónicas.

Actualmente hay dos problemas que están bajo estudio de nuestro equipo de trabajo: a) El verdadero control químico del autoensamblaje de nanoestructuras varias (nanotubos, nanoalambres, prismas y otros más. b) Determinar la influencia de los efectos de superficie y las propiedades electrónicas de nanopartículas metálicas y de óxidos binarios metálicos en los procesos de degradación de óxido nítrico y bióxido de azufre. La investigación está en proceso.

## Agradecimientos

A la DGAPA-UNAM, proyectos: IN100398, IN107700 y IN105102-2. M. en C. Geonel Rodríguez-Gattorno (estudiante de doctorado, FQUNAM). Señor Luis Rendón-Vázquez, (HR-TEM, IFUNAM). Doctor Juvencio Robles-García (Teoría, FQUGTO). M. en C. Octavio Álvarez-Fregoso (Películas finas, IIMUNAM). Doctora América Vázquez-Olmos (Síntesis y caracterización, CCADETUNAM). Doctor Antonio Campero-Celis (EPR, UAM-I). Doctora Silvia Castillo-Blum (Cinética, FQUNAM). Señorita Donají Velasco-Arias (estudiante de licenciatura, FQUNAM). Doctor Nicholas A. Kotov (OSU at Stillwater). Distinguished Profesor Janos H. Fendler (Clarkson University). Distinguished Professor. Imre Dékány, Mr. Károly Mogyorósi, Mr. József Németh and Ms. Rita Patakfálví, Szeged University (Hungarian Crew). DGEP-UNAM, por la beca concedida a GRG.



## REFERENCIAS

- Robles-García J., Mayorga O., Lee T. and Díaz D. PM3 Semiempirical Structure Calculations of Capped and Uncapped CdS Nanoparticles. *Nanostructured Materials*. 11, [2], (1999), 283-6.
- Díaz D.\*, Rivera M., Ni T., Rodríguez J-C., Castillo-Blum S. E., Nagesha D., Robles J., Álvarez-Fregoso O-J., and Kotov N. A.\*. "Conformation of Ethylhexanoate Stabilizer on the Surface of CdS Nanoparticles". *J. Phys. Chem. B*. 103, (1999), 9854-8.
- Díaz D., Robles J., Ni T., Castillo-Blum S. E., Nagesha D., Álvarez-Fregoso O-J., and Kotov N. A.\*. "Surface Modification of CdS Nanoparticles with  $\text{MoS}_4^{2-}$ ". *J. Phys. Chem. B*. 103, (1999), 9859-66.
- Díaz D., Rivera M., Castillo-Blum S. E., Rodríguez J-C., Ni T., Nagesha D., Robles J., Alvarez-Fregoso O-J., and Kotov N. A. Conformation of ethylhexanoate stabilizer on the surface of CdS nanoparticles. 2nd Internet Photochemistry and Photobiology Conference. In association with J.Photochem.Photobiol.B. July 16-Sept 7 1999. <http://www.photobiology.com/photobiology99/index.htm>.
- Kotov N. A.\*, Robles J.\*, Díaz D., Ni T., Castillo Blum S. E. Density Functional Study of CdS Nanoparticles Capped with  $\text{MoS}_4^{2-}$ . In *International Symposium on Cluster and Nanostructure Interfaces (ISCANI) (Proceedings)*, eds. P. Jena, B. Rao and S. Khanna, World Scientific, Singapore, 2000. 67-73.
- Rodríguez-Gattorno G., Díaz D.\*, Rendón-Vázquez L., and Hernández-Segura O. G. "Metallic Nanoparticles from Spontaneous Reduction of Silver(I) in DMSO. Interaction between Nitric Oxide and Silver Nanoparticles". *J. Phys. Chem. B*. 106, [10], (2002), 2487-92.
- Vázquez Olmos A\*, Díaz D.\*, Rodríguez-Gattorno G., and Saniger Blesa JM. Metal Ion Activated CdS Nanoclusters and their Interaction with PAMAM Dendrimers. Experimental and Theoretical Study (submitted and in review).



# *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas*

*Emilio Álvarez Parrilla\**

En la presente memoria se describe brevemente qué es la química supramolecular, así como su desarrollo histórico. A continuación se comenta el uso de las ciclodextrinas dentro de este campo de la química, haciendo especial hincapié en la obtención de estructuras supramoleculares poliméricas lineales y ramificadas. Estas estructuras se derivan de las interacciones no covalentes entre la molécula dítópica desoxicolato sódico con diversos dímeros y un trímero de b-ciclodextrina.

## Introducción

La química supramolecular es un campo emergente de la química que se define como “la química más allá de la molécula” debido a que estudia la formación de agregados organizados resultantes de la asociación de dos o más moléculas por medio de fuerzas intermoleculares (fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones donante-aceptor, etc.). Se caracteriza por ser sumamente interdisciplinaria, encontrándose en la frontera entre la química, la física y la biología, ya que las interacciones se pueden explicar desde un punto de vista químico o físico, y tienen un alto interés en las investigaciones biológicas. Por lo tanto, su influencia se extiende desde la química orgánica a través la síntesis y caracterización de nuevas moléculas capaces de formar estructuras supramoleculares, hasta los estudios bioquímicos del reconocimiento y transducción de una molécula a través de las membranas celulares, pasando por el estudio de los materiales poliméricos supramoleculares (plásticos, geles, proteínas, etc.). Gracias al estudio de la química supramolecular es posible entender cómo ligan y reconocen las enzimas a sus sustratos, o cómo logran que un medicamento sea asimilado más fácilmente (1, 2).

Los primeros antecedentes de la química supramolecular se remontan a los estudios de Emil Fischer, quien en 1894 postuló

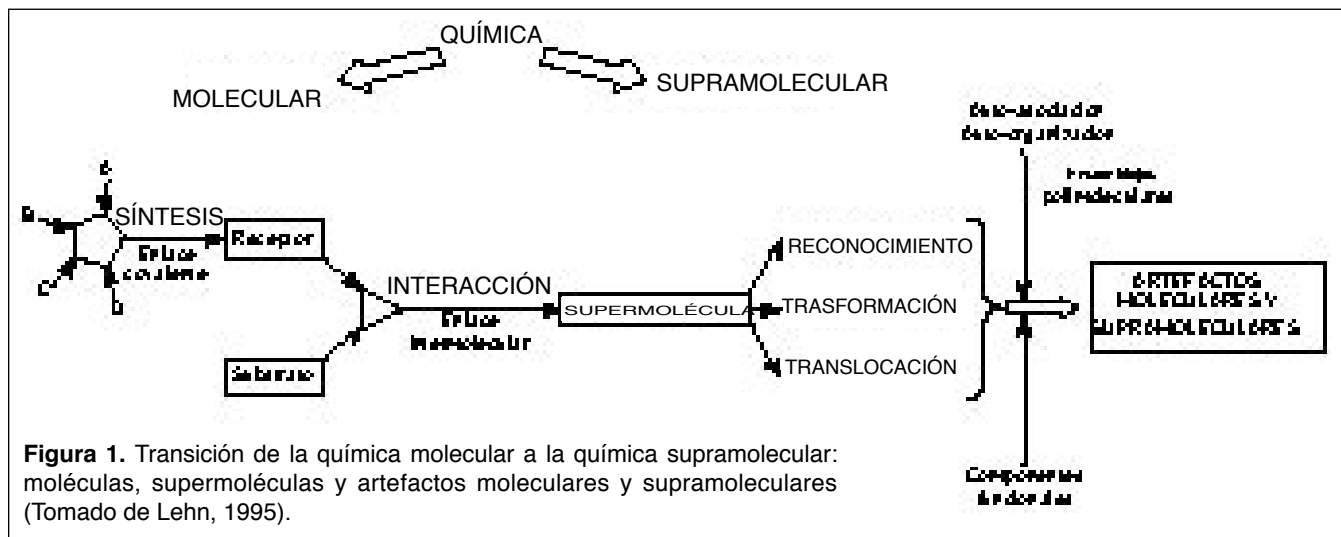
el principio de la “llave y la cerradura”, que relaciona la actividad de las enzimas con el acoplamiento del sustrato en el centro activo de la enzima, sentando las bases del reconocimiento molecular. Alfred Werner introdujo, en 1893, el concepto de coordinación, que es la afinidad necesaria entre los componentes para que la fijación selectiva se lleve a cabo. Y Paul Ehrlich introdujo, en 1906, el concepto de receptor, al determinar que las moléculas no actúan si no se asocian *Corpora non agunt nisi fixata* (1, 3).

Desde mediados de 1930 se han llevado a cabo estudios sobre las asociaciones de moléculas en disolución para formar entidades de mayor organización (como los dímeros de ácido acético) llamadas supermoléculas, *Übermoleküle*. Sin embargo, no es hasta 1978 cuando se introduce el término de química supramolecular para estudiar todos estos procesos de interacciones intermoleculares, al definir que las supermoléculas son para las moléculas y las interacciones intermoleculares, lo que las moléculas son para los átomos y los enlaces covalentes (4).

La química supramolecular se divide en dos grandes áreas, según el tamaño de los agregados formados: a) Supermoléculas, que son estructuras obtenidas a partir de la asociación de dos moléculas (oligomoleculares), y b) Artefactos supramoleculares, que se forman de la asociación de un número elevado de componentes, presentando características macroscópicas y estructuras microscópicas relativamente definidas (Fig. 1)

El esquema de la Figura 1 muestra la vía de evolución desde la química molecular a la química supramolecular. La unión, mediante interacciones intermoleculares de un sustrato natural o sintetizado químicamente (huésped) *s*, con el receptor (enzima, membrana celular, proteína, etc.) (hospedador) *r*, da lugar a la formación de la supermolécula *sr*. Esta supermolécula está caracterizada por la disposición espacial de sus componentes y por la naturaleza de las interacciones intermoleculares que la mantienen unida. Estas interacciones pueden tener diferente intensidad, desde débiles o medias para los enlaces de hidrógeno, hasta fuertes para interacciones de coordinación con iones metálicos. Sin embargo, su fortaleza siempre es menor que la de los enlaces covalentes, por lo que las

\* Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias Básicas, Programa de Química. Correo electrónico: ealvarez@uacj.mx



**Figura 1.** Transición de la química molecular a la química supramolecular: moléculas, supermoléculas y artefactos moleculares y supramoleculares (Tomado de Lehn, 1995).

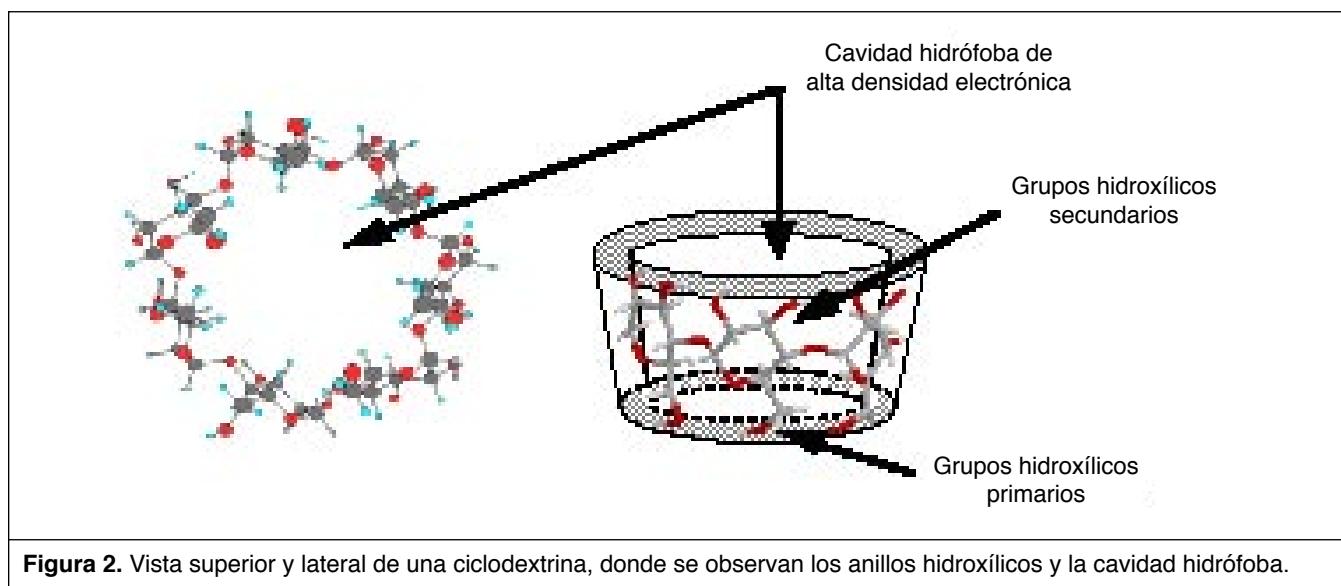
supermoléculas son cinéticamente más lábiles y dinámicamente más flexibles que las moléculas (3).

La formación de la supermolécula se está regulada por un proceso de reconocimiento molecular entre el receptor y el sustrato, que se basa en el principio de doble complementariedad postulado por Emil Fischer. Según este principio, para que un receptor  $r$  pueda formar una supermolécula con un sustrato  $s$ , es necesario que exista: a) una complementariedad estérica o geométrica, es decir, que el sustrato y el receptor tengan tamaño y forma compatibles, y b) una complementariedad en las interacciones electrostáticas, es decir, que los centros activos de ambas estructuras se encuentren en la dispo-

sición correcta para que las interacciones electrostáticas se puedan llevar a cabo. Tanto el receptor como el sustrato pueden tener en su estructura uno, dos o varios centros activos, recibiendo el nombre de receptor/sustrato monotópico, ditópico o politópico (4).

Este proceso de reconocimiento molecular recibe el nombre de proceso de inclusión (host-guest) o proceso de autoasociación (self-assembly), aun cuando este último término generalmente se utiliza para nombrar a las supermoléculas formadas.

Debido a la complejidad de las interacciones involucradas en la formación de las supermoléculas, se utilizan receptores modelos. Las ciclodextrinas están entre las moléculas más utilizadas como



**Figura 2.** Vista superior y lateral de una ciclodextrina, donde se observan los anillos hidroxílicos y la cavidad hidrófoba.

receptores modelo. Estas son un conjunto de moléculas cíclicas naturales obtenidas a partir de la degradación del almidón; constituidas por 6, 7 u 8 unidades de  $\alpha$ -D-glucosa unidas entre sí por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,4), y son denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente (5,6).

En la Figura 2 se observa una representación esquemática de la  $\beta$ -ciclodextrina, en la que se puede observar su estructura cíclica hueca, que le permite albergar moléculas orgánicas (huésped o sustrato) en su interior, mediante la formación de complejos de inclusión. Esta asociación les permite actuar como modelos de procesos supramoleculares y además les confiere una serie de aplicaciones en la industria farmacéutica, industria agroquímica, biotecnología, tecnología de alimentos, cosmética, tecnología medioambiental, entre otras. Las aplicaciones se realizan porque se incrementa la estabilidad física y química de la molécula huésped, la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos poco solubles y porque se reduce la pérdida de compuestos volátiles o se protegen los ingredientes activos frente a la oxidación (5, 6).

La formación de un complejo de inclusión entre una ciclodextrina y una molécula huésped se presenta de manera esquemática en la Figura 3.

Durante la formación del complejo de inclusión ocurren tres procesos: a) deshidratación total o parcial de la molécula huésped conforme entra en el interior de la ciclodextrina, b) desplazamiento del agua energéticamente desfavorable del interior de la ciclodextrina hacia el exterior, y c) ajuste de la posición del huésped para alcanzar la orientación termodinámicamente más estable. Esto involucra una secuencia de pasos hasta que el huésped consigue su orientación óptima, y tanto el huésped como la ciclodextrina alcanzan su grado final de hidratación. Cuando el huésped es muy grande, puede ocurrir que lo compleje más de una molécula de ciclodextrina, es decir que

la estequiometría sea 2:1 o superior (ciclodextrina: huésped) (7).

De manera general, se da por sentado que la estabilidad y estructura de los complejos formados depende fundamentalmente de factores geométricos y de polaridad, aun cuando otros factores como interacciones electrostáticas e impedimento estérico juegan un papel importante en la estructura y fortaleza de los complejos formados (6, 7).

### Polímeros supramoleculares con ciclodextrinas

Cuando se estudia la complejación de moléculas ditópicas (moléculas de gran tamaño que poseen dos sitios capaces de ser complejados) por dímeros de ciclodextrinas (molécula formada por la unión de dos ciclodextrinas mediante un puente o ligando), normalmente se acepta la hipótesis propuesta por Breslow y colaboradores (7, 8), que propone que durante este proceso se forman complejos de estequiometría 1:1 (Fig. 4a). En estos complejos existe un proceso cooperativo (denominado también quelante) que provoca que la constante de equilibrio obtenida sea mucho mayor que la esperada para el proceso estadístico de doble complejación por dos ciclodextrinas.

Sin embargo, el grupo de investigación de Físicoquímica de Coloides de la Universidad de Santiago de Compostela, España propuso que esta hipótesis no podía ser generalizada, ya que cuando moléculas ditópicas de gran tamaño son complejadas por dímeros de ciclodextrinas unidas por su cara primaria (cabeza-cabeza), cada sitio activo de la molécula huésped es complejado por una ciclodextrina de un dímero diferente, formando polímeros supramoleculares con estequiometría n:n, tal como se muestra en la Figura 4b. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se procedió a sintetizar una serie de dímeros cabeza-cabeza y a estudiar el proceso de complejación con la sal biliar desoxicolato sódico (NaDC), que se sabía por estudios

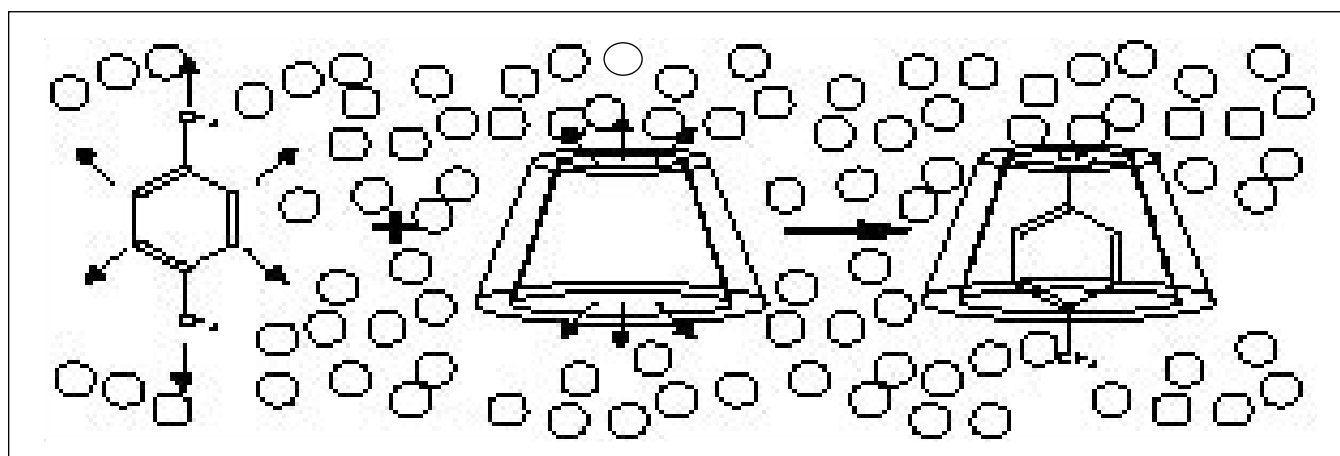
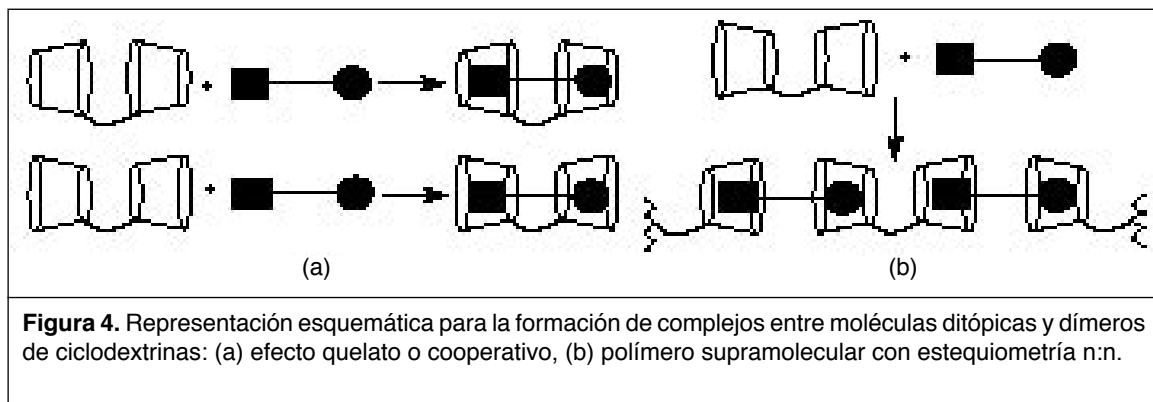


Figura 3. Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión (tomado de Szejtli, 1988).

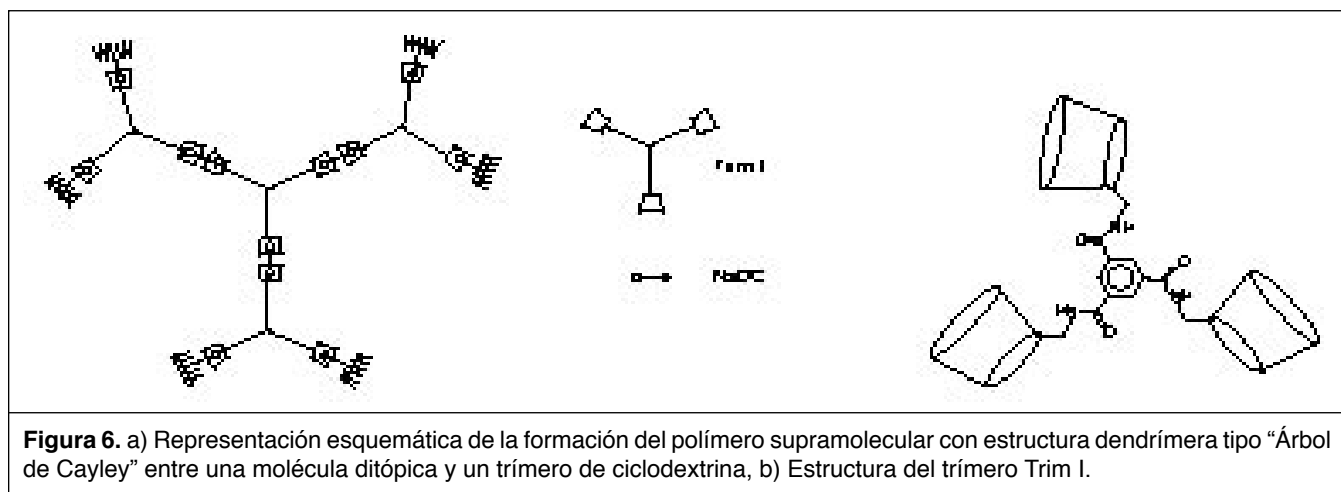
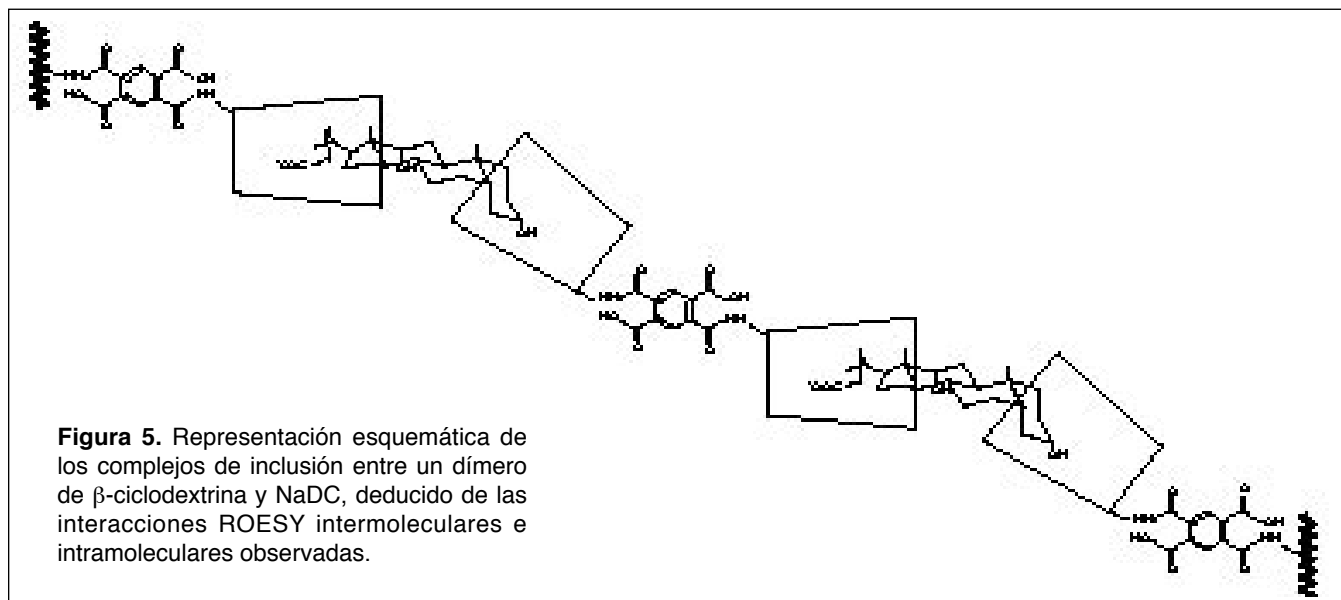


previos se comportaba como una molécula ditópica ideal. A partir del análisis de los resultados de resonancia magnético nuclear en dos dimensiones (ROESY), que permiten determinar las interacciones entre núcleos (protones) no vecinos que se encuentran contiguos, fue posible deducir la estructura de los complejos obtenidos, observando que en todos los casos se obtuvieron polímeros supramoleculares como el que se presenta de manera esquemática en la Figura 5 (9).

Una vez demostrada esta hipótesis, se planteó la posibilidad de obtener estructuras supramoleculares dendrímicas, del tipo árbol de Cayley, a partir de la complejación de una molécula ditópica por un trímero cabeza-cabeza (Fig. 6) (10). Para ello, se sintetizó el trímero Trim I, a partir de la reacción de acilación del monoamino derivado de la  $\beta$ -ciclodextrina (mono-6-desoxi-6-amino- $\beta$ -ciclodextrina) con el tricloruro del ácido 1,3,5 benceno tricarbóxico en presencia de una base (trietilamina), mediante un mecanismo  $SN_2$ , caracterizado por espectrometría de masas y resonancia magnético nuclear.

Posteriormente, se confirmó su capacidad para formar complejos de inclusión con estequiometría 1:3 (ciclodextrina: huésped), utilizando para ello como huésped una molécula relativamente pequeña (naftalen-2-sulfonato). Una vez comprobada la capacidad de formar estos complejos, se procedió a comprobar la hipótesis planteada.

Un dendrímero es un polímero ramificado tipo estrella o árbol, en el que la distancia entre todos los segmentos ramificados es la misma. Son utilizados como espaciadores, unidades estructurales de otros polímeros y como transportadores de fármacos, cosméticos, herbicidas, etc.

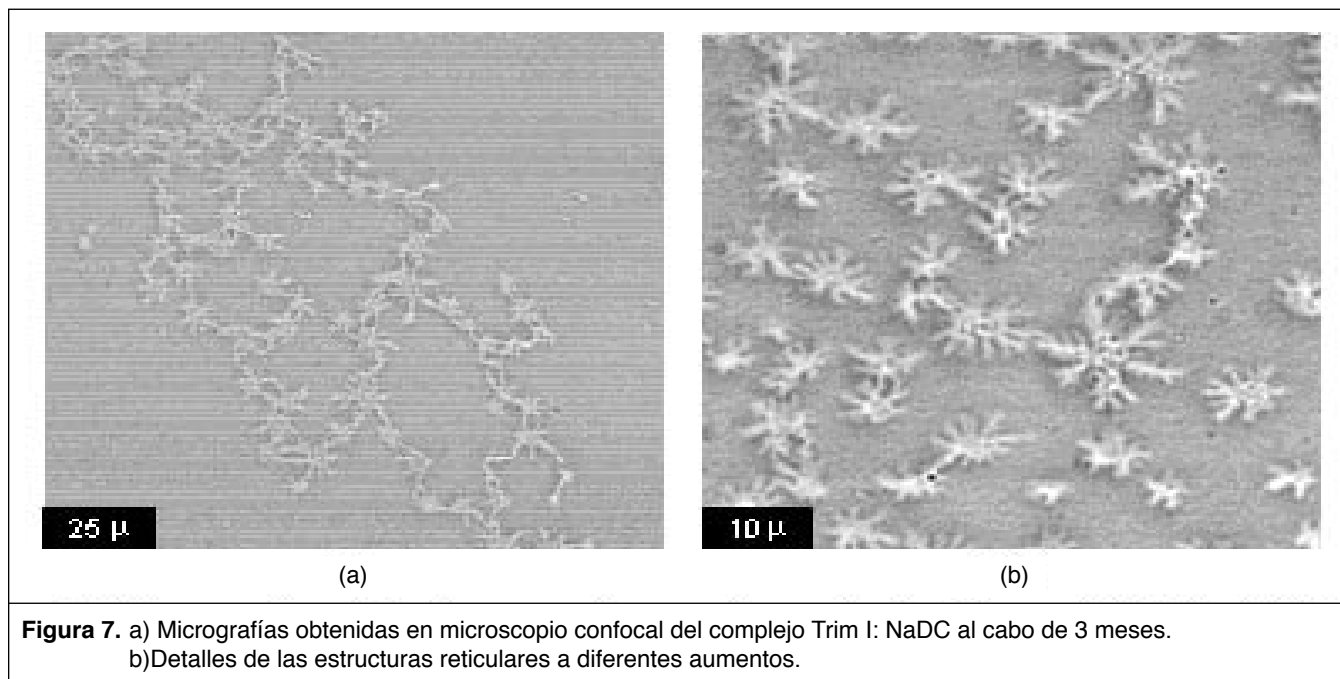


Para comprobar esta hipótesis, se preparó una disolución de NaDC y Trim I en una relación estequiométrica 1:2. La disolución se pasó a través de un filtro de 0.45 m para eliminar partículas extrañas y seguidamente se colocó dentro de un vaso de precipitados que contenía cubreobjetos en el fondo. Los vasos se taparon y se dejaron reposar durante tres meses para permitir que se formaran las posibles estructuras supramoleculares. Además, se preparó una solución de NaDC y otra de Trim I que fueron utilizadas como control.

Al cabo de los tres meses se observó, mediante microscopía confocal, que toda la superficie de los cubreobjetos estaba cubierta por una membrana con textura reticular uniforme, pero no se ob-

servaron agregados en los tratamientos de control. En la Figura 7 se presentan dos imágenes de un campo general de la superficie de esta membrana con un objetivo 60x.

En la Figura 7a se puede ver de manera más detallada una región de la estructura ramificada que constituye la membrana reticular. También se observa que esta estructura está a su vez formada por la unión, mediante filamentos, de núcleos de crecimiento.



La Figura 7b muestra un detalle a mayor aumento de estos núcleos de crecimiento, que presentan una estructura fractal con un crecimiento en forma de estrella. Al determinar la dimensión fractal de las estructuras presentes en esta micrografía, se constató que todas ellas eran muy similares, con un valor medio de  $D_f$   $1,63 \pm 0,02$ . Este valor fue más grande que el observado en un periodo de dos meses (intervalo entre 1.48 y 1.58).

A pesar de que no se hicieron estudios teóricos sobre la dimensión fractal esperada para estructuras formadas a partir del número de unidades de ciclodextrinas involucradas en el proceso de complejación (trabajo que se está llevando a cabo actualmente), es posible suponer que las diferencias en el valor  $D_f$  observadas experimentalmente sean debidas precisamente al diferente número de ciclodextrinas involucradas en los procesos de complejación. Así,

conforme aumenta el número de ciclodextrinas involucradas en el proceso de complejación, es de esperar que aumente el valor de la dimensión fractal de la estructura.

Es importante resaltar que este es el primer polímero supramolecular con estructura dendrímica obtenido a partir del reconocimiento molecular entre derivados de ciclodextrinas y moléculas huésped ditópicas. Ello puede ser la base para abrir una nueva línea de investigación dedicada a la obtención de derivados de ciclodextrina y/o moléculas huésped que presenten menor impedimento estérico, para facilitar la formación de estas estructuras supramoleculares, que en un futuro puedan llegar a ser utilizadas como instrumentos de liberación controlada de fármacos o transportadores de información, entre otros usos.



## REFERENCIAS

- (1) Lehn, J. M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, 1995.
- (2) Conn, M. M.; Rebek, J. J. *Chem. Rev.* 1997, 97, 1647-1668.
- (3) Weber, E.; Vögtle, F. *Introduction and Historical Perspectives*; en *Molecular Recognition: Receptors for Molecular Guests*; Ed. Vogtle, F.; Pergamon Press: Oxford, 1996.
- (4) Lehn, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1988, 27, 89-112.
- (5) Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, the Netherlands, 1988.
- (6) Álvarez-Parrilla E., 2000, Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- (7) Easton, C. J.; Lincoln, S. F. *Modified cyclodextrins*; Imperial College Press: London, 1999.
- (8) Breslow, R.; Halfon, S.; Zhang, B. *Tetrahedron* 1995, 51, 377-388.
- (9) a) Ramos Cabrer, P.; Álvarez-Parrilla, E.; Mejjide, F.; Seijas, J. A.; Rodríguez Nuñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* 1999, 15, 5489-5495,  
b) Alvarez-Parrilla, E., Ramos Cabrer, P., Pal Singh, A., Al-Soufi, W., Mejjide, F., Rodríguez Núñez, E. y Vázquez Tato, J.; *Supramol. Chem.* 2002, 14 (5), 397-404,  
c) Álvarez-Parrilla, E., Ramos Cabrer, P., Mejjide, F. y J. Vázquez Tato. *Biological Journal of Armenia*. 2001, Special issue: Cyclodextrins: 136-147.
- (10) Álvarez-Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Al-Soufi, W.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 2856-2858.



# *Perspectiva de los organismos genéticamente modificados*

**Mario Gaytán Alcocer\***

A los organismos en los que el hombre ha introducido genes de otra especie comúnmente se les ha denominado transgénicos u OGM (Organismos Genéticamente Modificados). También se hacen modificaciones genéticas introduciendo, suprimiendo o multiplicando genes de la misma especie. La mayoría de los OGM agrícolas son productos diseñados para resolver problemáticas productivas específicas y para ser comercializados directamente (granos, frutas y hortalizas) o como productos derivados (harinas o aceites). Las biotecnologías que utilizan el ADN (ácido desoxirribonucleico) recombinante permiten identificar y clonar genes asociados con atributos específicos. Estas técnicas pueden aislar el ADN, hacer múltiples copias de ciertos fragmentos, obtener las secuencias de aminoácidos y realizar diversas operaciones que en conjunto nos permiten caracterizar y manipular el material genético de cualquier organismo. Sin embargo, los potenciales riesgos y beneficios de los OGM deben ser evaluados sin olvidar que su eventual liberación al medio ambiente sucederá en un contexto ecológico, productivo y cultural concreto.

## **Introducción**

Desde el nacimiento de la agricultura, la especie humana ha sido capaz de modificar las características genéticas de plantas y animales, utilizando una biotecnología básica que podríamos llamar "suave". La domesticación de cultivos vegetales y razas animales es el resultado de un largo proceso histórico y cultural de selección que ha producido una gran diversidad genética dentro de las especies domesticadas.

El mecanismo mediante el cual se producen actualmente la mayoría de las nuevas variedades e híbridos en la agricultura, se

basa en la cruce de organismos cercanamente emparentados y en procesos de retrocruzamiento, segregación, selección y evaluación agronómica que consumen tiempos relativamente largos.

En cambio, la biotecnología moderna produce organismos vivos que poseen combinaciones novedosas de material genético que no existían antes en la naturaleza. La diferencia entre la biotecnología moderna y la tradicional es que ahora se pueden obtener variedades de plantas a las que se introducen directamente genes obtenidos de especies muy diferentes, incluidas bacterias y virus.

A los organismos en los que el hombre ha introducido genes de otra especie comúnmente se les llama transgénicos u OGM (Organismos Genéticamente Modificados). También se hacen modificaciones genéticas introduciendo, suprimiendo o multiplicando genes de la misma especie (4,9).

Es en la agricultura donde la biotecnología vegetal está a la vanguardia de transgénicos y producción masiva de los mismos. Sin embargo, hay que apuntar que la manipulación genética está realizándose en otros organismos (roedores, bacterias, protozoarios, invertebrados y peces) con diferentes objetivos productivos y en diversos ambientes (pesquerías, biorremediación ambiental de agua y suelos, control biológico de plagas e inmunología humana y pecuaria) (6, 20).

La comunidad científica internacional reconoció de inmediato que existían riesgos en esa nueva biotecnología y recomendó proceder con precaución y con base en información científica. Haciendo eco a esta preocupación, diversos gobiernos modificaron normas y reglamentos existentes o iniciaron otros para evaluar los riesgos de la liberación al medio ambiente de OGM y la comercialización de estos y sus productos derivados.

Un claro ejemplo del compromiso mundial de atender esta problemática es el proceso de negociación de un Protocolo sobre Bioseguridad para el movimiento transfronterizo de transgénicos en el marco del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Proceso que inició en 1994 y cuyas primeras dos rondas de negociación tuvieron lugar en Montreal, Canadá (agosto de 1998) y Cartagena,

\* Profesor de T. C. del ICB, de la UACJ. Correo electrónico: mgaytan@uacj.mx. Correspondencia: Anillo Envolvente del Pronaf y Estocolmo s/n, C.P. 32310, Ciudad Juárez, Chih., México.

Colombia (febrero de 1999) (13, 17, 22).

La mayoría de los OGM agrícolas son productos diseñados para resolver problemáticas productivas específicas y para ser comercializados directamente (granos, frutas y hortalizas frescas) o como productos derivados (harinas o aceites). Si bien el contexto agrícola y ecológico constituye el enfoque prioritario, también comentaremos en forma breve temas como el consumo humano de OGM o sus productos, la propiedad intelectual, las posibles consecuencias sociales y económicas de la introducción de semillas de origen transgénico en el campo mexicano y la situación de la agenda internacional en bioseguridad (2,3).

### Nacimiento de la ingeniería genética de plantas

En los años setenta se describieron los primeros métodos para manipular genéticamente diversos organismos y en los ochenta se desarrollaron técnicas para incorporar genes en plantas. En la última década del siglo pasado se consolidó la capacidad de transformar genéticamente a los seres vivos, produciendo organismos novedosos sin precedente natural.

Las primeras pruebas de campo con OGM se llevaron a cabo en 1986 en Estados Unidos y en Francia. En la década de 1986 a 1995, se realizaron cerca de 15 mil pruebas con 56 cultivos y seis características nuevas en 34 países. De 1996 a 1997 se hicieron 10 mil pruebas incluyendo cuatro nuevos cultivos y un total de 10 características. Respecto al promedio anual de los diez años previos, para 1997 se había multiplicado por siete el número de pruebas (18).

Estas actividades siguen creciendo con rapidez, sobre todo en Estados Unidos y Canadá, donde ya se ha aprobado para liberación al medio ambiente y para consumo, un gran número de OGM en cultivos como maíz, jitomate, papa, soya, algodón, canola, calabaza, remolacha y papaya. La superficie sembrada con maíz modificado genéticamente aumentó de 160 mil hectáreas en 1996, a 1.2 millones en 1997 y a 7 millones en 1998 (2).

Las biotecnologías que utilizan el ADN (ácido desoxirribonucleico) recombinante permiten identificar y clonar genes asociados con atributos específicos. Estas técnicas pueden aislar el ADN, hacer múltiples copias de ciertos fragmentos, obtener las secuencias de aminoácidos y realizar diversas operaciones que en conjunto nos

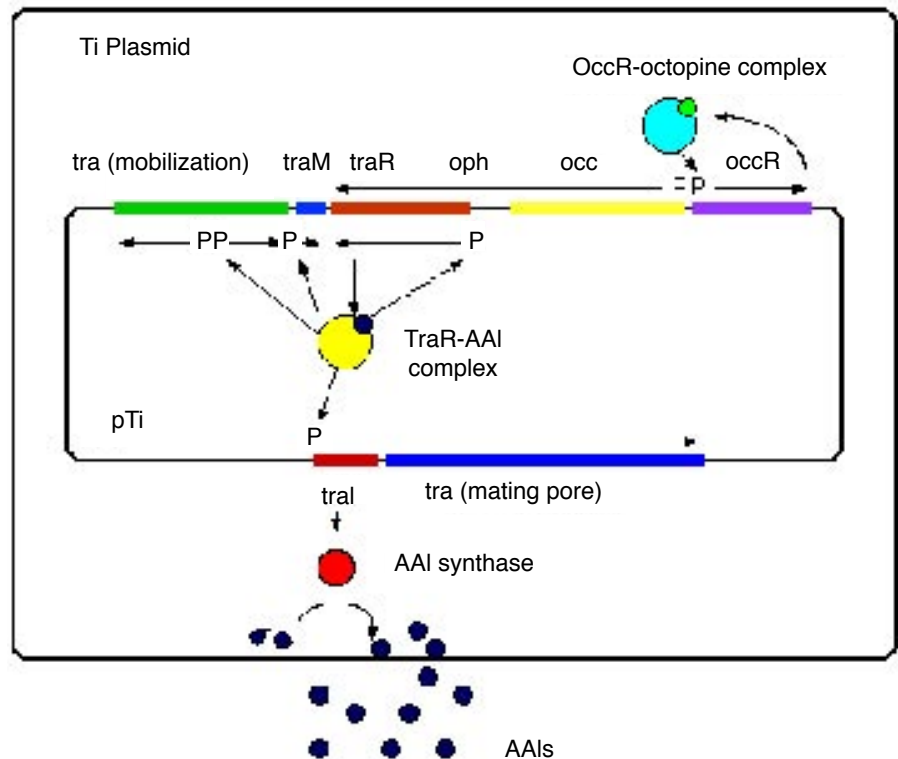
permiten caracterizar y manipular el material genético de cualquier organismo.

La transferencia exitosa de genes a una planta fue posible por primera vez al descubrirse que una bacteria del suelo (*Agrobacterium tumefaciens*) podía transferir un fragmento de su propio ADN al genoma del núcleo de células vegetales. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria que induce tumores a la planta. Los genes que permiten que el organismo exhiba esta calidad transformante residen en un plásmido grande, el Ti, esquematizado en el Cuadro 1. Existen dos regiones principales, situadas en este plásmido que son esenciales para la inducción del tumor.

El primero de éstos es la región Vir, que contiene a los genes que se expresan en la bacteria, los cuales se requieren para la transferencia del T-ADN (ADN inductor del tumor) a las células de la planta. La segunda región principal es la región T, que se transfiere a la célula de la planta, donde se integra en uno de los cromosomas del hospedero como T-ADN que codifica la producción de las hormonas auxina y citoquinina de la planta, responsables de la formación del tumor, además de una molécula específica denominada opina. Así, la agrobacteria infecta a las células de la planta con el plásmido Ti. Estas secretan a las opinas, que son producto del T-ADN.

Las opinas sirven como parte del proceso de conjugación de la agrobacteria. La regulación de este sistema se lleva a cabo en un

**Cuadro 1.** Plásmido Ti de *A. tumefaciens*



lugar conocido como acumulador, situado en el plásmido pTiC58 del Ti. El acumulador se compone de ocho genes: accR - accG. Los genes se pueden dividir en tres grupos (ver Cuadro 2).

Otro componente principal que se requiere para la iniciación de la recombinación es el autoinductor AI. Esta molécula es producida dentro de las células bacterianas después de la inducción de las opinas. El gen que codifica para la producción del autoinductor se conoce como traI y está situado dentro de la región tra en el plásmido Ti. La región tra, consiste en cinco genes, traR, traA, traC, traN y traI. TraI sintetiza la lactona de la molécula N-(3-oxo-octanoyl)-L-homoserina, que funciona como feromona del autoinductor AI. Esta molécula sirve también para estimular la expresión de traR formando un complejo traR-traR-AI, que activa la transcripción de varios genes requeridos para la transferencia del plásmido Ti en otras células bacterianas, además de otros genes. Así, esta molécula se cree tiene la función de un segundo mensajero para transmitir la señal de la opina a las células bacterianas, particularmente en los casos donde la respuesta necesita ser amplificada debido a las concentraciones de opinas.

Se postula que el papel del autoinductor es fijar al producto del gen traR y aumentar la afinidad de traR para otras moléculas de traR o para el ADN de la caja tra (u otra macromolécula, tal como la polimerasa del ARN). Existe evidencia para implicar que el traR activo existe en forma di u oligomérica. TraR controla la expresión de por lo menos cinco promotores. La expresión de traR es regulada positivamente y negativamente. TraR tiene funciones autorregulatorias cuando está limitado el autoinductor. Uno de los genes que se expresa como resultado de este proceso es traN que regula negativamente la expresión de traR.

Inicialmente, las bacterias infectan a las células de la planta inyectando el DNA del plásmido Ti. Las células de la planta producen las moléculas conocidas como opinas, que son las moléculas señal para que la Agrobacteria inicie el proceso genético. La molécula autoinductora se expresa en respuesta de la cantidad de opinas presentes dentro de la célula. El autoinductor entonces se une al producto del gen traR, alterando su conformación y permitiendo que se fije a los promotores dentro de la región tra. Esto activa la

transcripción de los genes tra que se requieren para la transferencia del plásmido Ti en otras células. La proteína producto del gen traN (por demostrar) sirve para prevenir la expresión de los genes tra cuando la concentración de opinas, el autoinductor y traR están disminuidas (23).

Otro método que se desarrolló posteriormente fue la balística biológica, basado en la idea de “forrar” minúsculas partículas de metal con material genético y dispararlas para penetrar la pared y la membrana celular e incorporar el material genético a las células vegetales.

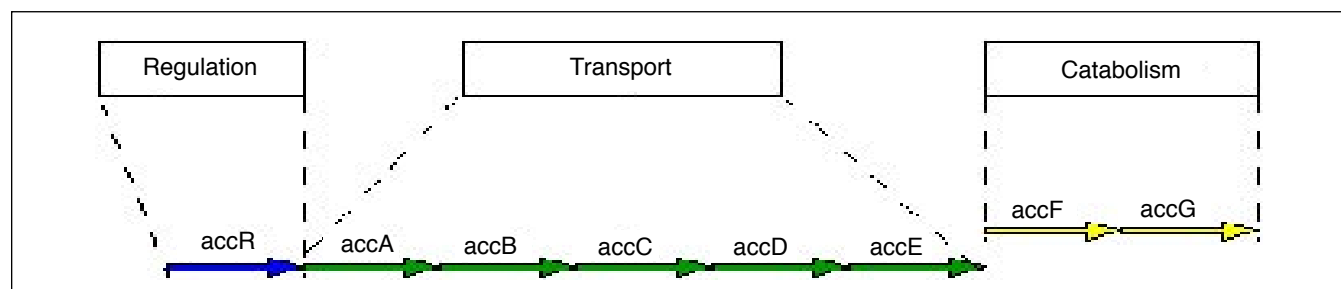
Si bien estas son las técnicas que hasta ahora han permitido producir plantas transgénicas, están en desarrollo y perfeccionamiento gran variedad de enfoques y métodos que utilizan nuevos vectores y diseños genéticos y moleculares (20).

La identificación de los genes que confieren las características que queremos modificar o introducir, es un componente esencial de la biotecnología. Hay genes que ya se conocen bien y han sido manipulados ampliamente, otros ya han sido identificados y pronto serán utilizados para mejorar cultivos. Sin embargo, muchas características que sería útil emplear, son reguladas por un gran número de genes, por lo que su manipulación mediante ingeniería genética es muy compleja y es probable que el fitomejoramiento tradicional sea una mejor técnica para manejar este tipo de características.

Independientemente de la técnica utilizada, la producción exitosa de plantas modificadas requiere que se identifiquen y aislen genes que sea útil transferir, que la nueva construcción genética sea estable y que en generaciones posteriores la característica introducida aún se exprese. En la mayoría de los casos, los genes se transfieren a variedades de plantas que ya son utilizadas y comercializadas.

En nuestro país, la capacidad de producir plantas transgénicas inició con la creación del Departamento de Ingeniería Genética de Plantas de la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV/IPN), fundado por el doctor Luis Herrera Estrella, autor principal de uno de los artículos que en 1983 demostró que era posible manipular a las plantas mediante la ingeniería genética.

**Cuadro 2.** Acumulador del plásmido Ti



Hoy día, ya se han incorporado a esta línea de desarrollo científico y tecnológico grupos de investigación de instituciones nacionales como el Instituto de Biotecnología y el Centro de Fijación de Nitrógeno de la UNAM, el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), el Colegio de Posgraduados, la Universidad de Aguascalientes y el Instituto Tecnológico de Celaya. Además, existe un grupo de biotecnología agrícola radicado en México que pertenece al Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT) (16).

El sistema educativo en biotecnología ha mejorado sustancialmente en la última década, México ya tiene 19 programas de posgrado en la materia dentro de instituciones mexicanas. Existen cerca de 75 laboratorios de investigación agrícola biotecnológica y más de 200 investigadores activos en este campo.

Actualmente, en el CINESTAV-Irapuato se realizan pruebas de campo precomerciales con tres variedades de papa resistentes a virus y en etapa de prueba y/o modificación de variedades comerciales hay jitomate, papaya y espárrago resistentes a virus; trigo y maíz con tolerancia al aluminio; plátano de lenta maduración; frijol resistente al "tizón de halo", y plátano y jitomate para producir vacunas humanas.

En el Instituto de Biotecnología de la UNAM se han clonado genes de plantas que permitirán producir plantas transgénicas con mayor tolerancia a la sequía y al calor. En colaboración con CIMMYT, este Instituto también ha caracterizado una gran cantidad de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas para determinar su efectividad sobre larvas de insectos que dañan cultivos mexicanos.

Desde hace más de tres años, el INIFAP participa junto con CIMMYT y otras instituciones en un proyecto internacional de investigación que tiene como objetivo transferir apomixis al maíz. Esta forma de reproducción asexual es una característica que podría dar mayor estabilidad a los híbridos de maíz (10, 14, 15).

El CICY utiliza desde hace más de 10 años cultivos celulares y organismos transgénicos de toloache y vicaria para la obtención de compuestos farmacéuticos. Estos desarrollos biotecnológicos no involucran liberar al medio ambiente un OGM.

En febrero del año 2000, se formó la Red Mexicana de Biotecnología Agrícola que reúne a más de 10 instituciones y que tiene el propósito de crear una base de datos compartida y facilitar la comunicación entre los científicos dedicados a la biotecnología agrícola, así como hacer un diagnóstico sobre la biotecnología en México y generar un foro de opiniones sobre políticas en bioseguridad y acceso a los recursos genéticos y biotecnológicos (18).

Numerosas empresas mexicanas producen bebidas alcohólicas y derivados de lácteos con biotecnologías tradicionales; además de éstas, en México existen más de 70 empresas que utilizan biotecnología moderna y que son, en su mayoría, empresas pequeñas

que rara vez trabajan en asociación con instituciones mexicanas de investigación.

El grupo Pulsar (ahora llamado Savia) es la única empresa mexicana que utiliza ingeniería genética para desarrollar nuevas variedades de hortalizas y frutales. Esta compañía opera globalmente en la comercialización de semillas (algunas transgénicas) y en la producción y distribución de percederos. El tipo de agroindustria que desarrolla este grupo es diferente a la de los grandes agroexportadores de granos transgénicos, ya que sus productos van directamente a la venta para consumo humano y pocos de ellos tienen como fin el procesamiento industrial.

La infraestructura y los recursos humanos con que cuenta la biotecnología en México tienen alta calidad reconocida mundialmente. Sin embargo, esta capacidad es aún pequeña en relación con la población del país y con el valor económico de la producción agrícola.

Los potenciales riesgos y beneficios de los OGM deben ser evaluados sin olvidar que su eventual liberación al medio ambiente sucederá en un contexto ecológico, productivo y cultural concreto (1, 5, 7, 19). Es por ello que consideramos aquí aspectos básicos de la diversidad del México rural que conforman el complejo escenario donde actuará la biotecnología agrícola.

Nuestro país posee una inigualable riqueza botánica y zoológica tanto por su cantidad (mayor al 10% de la diversidad mundial) como por su calidad (un alto porcentaje de las especies son exclusivas de nuestro territorio). La diversidad de ecosistemas y tipos de vegetación es igualmente sorprendente. Semejante riqueza biológica se debe a la gran variedad de topografía, climas, suelos y geología, así como a los complejos fenómenos que han moldeado la geografía y la biota en el territorio de México.

Esta matriz biológica y ecológica es el escenario donde nacieron las civilizaciones mesoamericanas desarrolladas de la mano de la agricultura, y cuyos herederos en la actualidad poseen una gran diversidad cultural y un profundo conocimiento sobre sus recursos biológicos, ejemplificado por las miles de plantas utilizadas con fines medicinales.

La expresión más notable de la relación entre diversidad biológica y cultura es la domesticación de plantas y animales. El centro mesoamericano de origen y diversidad de plantas cultivadas es uno de los más importantes del mundo. Entre los cultivos domesticados aquí y de los que aún se cultivan variedades nativas podemos mencionar: maíz, frijol, calabaza, algodón, cacao, chile, papaya, aguacate, vainilla, camote, chayote, y plantas ornamentales como nochebuena, dalia y cempasúchil (9).

En nuestro territorio también habitan numerosos parientes silvestres de estos cultivos, mismos que forman parte integral de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación. La importancia de los parientes silvestres y las variedades semidomesticadas y criollas de cada cultivo, cuyos custodios han sido los campesinos e indígenas de México, estriba en que son fuente de

variación genética y de atributos o características que pueden ser aplicados al mejoramiento y la transformación de los cultivos ante los profundos cambios ambientales, productivos y comerciales que enfrenta la agricultura.

Las diferentes facetas de la diversidad biológica constituyen un patrimonio de gran valor para nuestro país. Este capital natural es de vital importancia para México debido a los servicios ambientales que prestan tanto los ecosistemas naturales, agrícolas y silvícolas en la captación de agua pluvial y la reposición de acuíferos, la producción alimentaria, la conservación de suelos y el mantenimiento de su fertilidad, así como en la regulación de los climas locales y gases atmosféricos (especialmente la captura de CO<sub>2</sub>).

La biodiversidad de México enfrenta amenazas como la tala inmoderada, la depredación, los incendios, la sustitución de cultivos, la invasión ganadera y el manejo inadecuado de los recursos cuyas consecuencias son casi siempre la destrucción y degradación de los hábitats naturales, la extinción de especies y la disminución de la diversidad en los cultivos. Así, los riesgos derivados de los OGM son un elemento más que debe ser manejado cuidadosamente para que el potencial positivo de la biotecnología se concrete y se eviten los efectos negativos sobre la diversidad genética y biológica (8, 21).

## REFERENCIAS

- (1) Begon, M. et al. (1990). "Ecology". Blackwell Scientific Publications, 2° Ed.
- (2) Brown, K. et al. (2001). "G.M. Foods: Are they safe?" Special Report. *Sci. Am.*, Vol. 284, No. 4; pp. 38-51.
- (3) CONACYT y CONABIO (1999). "Organismos vivos modificados en la agricultura mexicana: desarrollo biotecnológico y conservación de la diversidad biológica".
- (4) Convenio sobre la Diversidad Biológica, Montreal, 1998.
- (5) Ewan, S.W.B. and Pasztai A. Pasztai (1999). "Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* Lectin on rat small intestine". *Lancet*, Vol. 354, No. 9187, pp. 1353-1354.
- (6) Kahn, A. (1999). "Transgenic Plants in agriculture". J. & Co. Ltd. Eds.
- (7) Kuiper, H.A. et al. (1999). "Adequacy of methods for testing the safety of genetically modified foods". *Lancet*, Vol. 354, No 9187, pp. 1315-1316.
- (8) Kwiakowska, T. Y López-Wilchis, R. (compiladores) (2000). "Ingeniería Genética y Ambiental". Plaza Valdez Ed.
- (9) Larson, G.J. (2001). "Transgénicos: Ciencia y Ciudadanía". *Biodiversitas*, año 6, No. 34; pp. 1-7.
- (10) Martínez- Soriano, J. P. et al. (2000). "Transgenic maize in México: no need for concern". *Science*, Vol. 287, No. 5487; pp. 1399.
- (11) Marvier, M. (2001). "Ecology of transgenic crops". *American Scientist*, Vol. 89, No. 2, pp. 160-167.
- (12) Nigh, R. et al. (2000). "Transgenic Crops: a cautionary tale". *Science*, Vol. 287, No. 5460; pp. 1927.
- (13) Nuffield Council, 4 Th. Bioethics Session, 1996.
- (14) Piñero, D. (2001). "Reflexiones para una política sobre organismos transgénicos en México: El caso del maíz". *Biodiversitas*, año 6, No. 34; pp. 8-10.
- (15) Ponce de León G.L. (2001). "Antes de la liberación de maíz transgénico es imprescindible un estudio de su impacto ecológico en México". *Cemenáhuac*, Vol. VI, año IX, No. 19; pp. 2-3.
- (16) "Primer Foro Nacional sobre biotecnología y bioseguridad en la agricultura mexicana". (Ciudad de México, 15 y 16 de enero de 2001).
- (17) Protocolo sobre Bioseguridad, Cartagena 2000.
- (18) Seminario Alimentos Biotecnológicos y Salud (Ciudad de México 23 marzo del 2001).
- (19) Serratos J.A., Willcox M.C. y Castillo F. (eds.) (1996). "Foro flujo genético entre el maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: implicaciones para maíz transgénico". México, D.F., CIMMYT.
- (20) *Transgenic Plants and World Agriculture*. (2000). Royal Society of London, U.S. National Academy of Sciences, Brazilian Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences, Mexican Academy of Sciences, National Academy Press.
- (21) Wheelwright, J. (2001). "Maíz con genes alterados". *Discover en Español*. Vol. 5, No. 4; Pp. 26- 33.
- (22) World Health Forum 2000. "Genetics: Promises and Perils". Dallas, Forth Worth, Texas, 25/11/ 2000.
- (23) [www.tigr.org/tigr-scripts/cmr2/genomepage3.spl?database=ntato1](http://www.tigr.org/tigr-scripts/cmr2/genomepage3.spl?database=ntato1).



# *Fitorremediación de metales pesados y formación de nanopartículas usando plantas de alfalfa*

*Jorge L. Gardea-Torresdey<sup>1</sup>, Eduardo Gómez<sup>1</sup>, José R. Peralta-Peralta-Videa, Kirk J. Tiemann, Jason G. Parsons, Horacio Troiani y Miguel José Yacaman<sup>2</sup>*

La fitorremediación, el uso de plantas para limpiar suelos y aguas contaminadas, se ha convertido en una alternativa promisoría para recuperar metales de manera ambientalmente amigable. Algunas especies de plantas utilizadas en este proceso también pueden absorber metales preciosos. La presente investigación de laboratorio e invernadero, ha demostrado que tallos de plantas de alfalfa de 15 días de edad cultivadas separadamente con 320 mg L<sup>-1</sup> de KAuC14 y de AgNO<sub>3</sub>, almacenaron 264 y 120 mg de oro y plata por kg de biomasa seca, respectivamente. Además, estudios de microscopía electrónica de transmisión demostraron que estas plantas formaron nanopartículas de oro o plata. Estos resultados mostraron por vez primera que es posible la síntesis de materiales nanoestructurados en plantas vivas, y que en el futuro se pueden encontrar otros tipos de agregación de nanopartículas y obtener estructuras de valor incalculable para la ciencia y la tecnología.

## Introducción

Los metales preciosos han sido extensamente utilizados en varias industrias y procesos tales como electrónica, fotografía, emisión catalítica y medicina. Por tal razón, metales como el oro y la plata han desempeñado un papel esencial en nuestras vidas. Recientemente, partículas submicroscópicas de metales pesados conocidas como nanopartículas están atrayendo la atención de industriales y científicos; su tamaño oscila entre 1 y 100 nm y son estudiadas por la nanociencia, una rama de la ciencia que es relativamente nueva y que está dedicada al mejoramiento y utilización de instrumentos y estructuras en donde se observan nuevas propiedades químicas, físicas y biológicas (1, 2). Por

otro lado, los métodos tradicionales utilizados para recuperar los metales preciosos han tenido un impacto negativo en el ambiente, debido a la toxicidad de las sustancias químicas utilizadas en dicho proceso.

La fitorremediación, el uso de plantas para limpiar suelos y aguas contaminadas, se ha convertido en una alternativa promisoría para recuperar metales de manera ambientalmente amigable (3-5). Algunas especies de plantas utilizadas en fitorremediación también pueden absorber metales preciosos (6). Estudios de laboratorio e invernadero han demostrado que plantas de alfalfa tienen alta capacidad para absorber metales pesados (5) y para formar nanopartículas de oro (7). Con base en esas observaciones, se investigó la habilidad de estas plantas para absorber, independientemente, oro y plata y formar nanopartículas de estos metales. En esta investigación se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (TEM) con resolución atómica y un espectroscopio de absorción de rayos X (XAS) para confirmar la formación y el agregado y crecimiento de nanopartículas de oro y plata dentro de la planta de alfalfa.

## Materiales y métodos

**PREPARACIÓN DEL MEDIO Y SIEMBRA:** Semillas de alfalfa de la variedad Mesa fueron sumergidas en formaldehído al 3% durante 15 minutos y enjuagadas tres veces con agua desionizada estéril como lo indican Peralta et al. (5). Aproximadamente 50 semillas fueron colocadas en frascos Mason de 400 mL de capacidad que contenían 200 mL de medio nutritivo ajustado a pH 5.8, previamente esterilizado en autoclave a 1.2 kg cm<sup>2</sup> de presión durante 30 minutos. Se utilizaron concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 mg L<sup>-1</sup> de Oro(III) de la sal tetracloroaurato de potasio. El medio previamente descrito (5), fue modificado para el estudio de la plata. Las sales de cloruro fueron sustituidas por sales de nitratos o sulfatos para evitar la formación de cloruro de plata. Solamente se conservaron las sales MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O y FeCl<sub>3</sub> como fuentes de cloro, requerido para la nutrición de las plantas. Como fuente de plata se utilizó nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) a las concentraciones 0, 40, 80, 160, y 320 mg de plata por litro de solución. El

<sup>1</sup>Departamento de Química y Programa Doctoral en Ingeniería y Ciencia Ambiental, Universidad de Texas en El Paso, El Paso, TX 79968; Tel: (915) 747-5359; Fax: (915) 747-5748, E-mail: jgardea@utep.edu.

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Texas en Austin, Austin, TX 78712-1062.

**Tabla 1.** Absorción y transporte de oro en plantas de alfalfa. Los datos representan el promedio de  $40 \pm 5$  plantas.

| mg kg <sup>-1</sup> en el medio | Concentración en raíces (mg kg <sup>-1</sup> ) | Error estándar | Concentración en tallos (mg kg <sup>-1</sup> ) | Error estándar |
|---------------------------------|--|----------------|--|----------------|
| Au 10                           | 356  | 54             | 56   | 6              |
| Au 20                           | 317  | 26             | 16   | 1              |
| Au 40                           | 357  | 17             | 33   | 2              |
| Au 80                           | 998  | 63             | 34   | 3              |
| Au 160                          | 1779   | 161            | 88   | 3              |
| Au 320                          | 5704   | 109            | 264  | 22             |

medio fue solidificado utilizando 5 g L<sup>-1</sup> de Difcobacto agar. Todos los frascos fueron cubiertos con plástico transparente después de la siembra, para evitar contaminación externa y permitir la iluminación. Las plantas fueron expuestas a 12 h de luz, 25°C e irradiación de 39 imolm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>. Cada tratamiento fue replicado tres veces para propósitos estadísticos.

**DETERMINACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE ORO Y PLATA POR LAS PLANTAS DE ALFALFA:** Las plantas fueron cosechadas después de dos semanas de crecimiento. Después de la cosecha, las plantas de cada repetición fueron sumergidas por 10 segundos en una solución 0.01M de HNO<sub>3</sub> y enjuagadas tres veces con agua desionizada. Seguidamente se separaron los tallos de las raíces y se secaron en un horno durante 72 h a 70°C, se registraron los pesos y se disolvieron en 6 mL de HNO<sub>3</sub> de alto grado de pureza utilizando un horno de microondas CEM (Marsx, Mathews, NC 28105-5044). Después de la digestión, las muestras fueron aforadas a 10 mL utilizando agua doble desionizada y se les determinó el contenido de oro y plata mediante espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP/OES) (Perkin-Elmer Optima 4300 DV).

**ESTUDIOS DE ABSORCIÓN DE RAYOS X (XAS):** Los estudios de absorción de rayos X fueron realizados para determinar el estado de oxidación y los posibles grupos funcionales que ligan el oro y la plata dentro de la planta de alfalfa. Las raíces y tallos previamente lavados fueron sumergidos por separado en nitrógeno líquido durante 40 min y posteriormente fueron secados al vacío utilizando un sistema de secado en frío (Freeze Dry System) durante dos días para remover el agua de las muestras. Las muestras deshidratadas fueron pulverizadas utilizando mortero y pistilo y colocadas en la ranura de 1.00 mm de diámetro de una placa de aluminio, fueron cubiertas con tape Mylar y analizadas en el Laboratorio de Radiación Sincrotrón de la Universidad de Stanford (Stanford Synchrotron Radiation Laboratory —SSRL—).

**ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM):** Muestras de tejido sin teñir fueron inmersas en resina sintética y secadas en un horno a 60°C durante 24 h; después fueron cortadas

con micrótopo (~ 50 nm de espesor), colocadas en una base de Cu y analizadas en el TEM. Las posibles fuentes de contraste en las muestras fueron el grosor, el contraste en la difracción y las propias nanopartículas de oro y plata. Los cortes de tejido fueron analizados en un TEM modelo A JEOL 2010-F, equipado con un sistema de dispersión de energía de rayos X (X-ray EDS) para estudiar las nanopartículas dentro de la planta.

## Resultados y discusión

**ABSORCIÓN DE ORO Y PLATA POR LAS PLANTAS DE ALFALFA.** La concentración de oro encontrada en las raíces y tallos de las plántulas de alfalfa se muestra en la Tabla 1. Como se observa en la tabla, la concentración calculada de oro (con base en el peso seco) en las raíces osciló entre 356 mg kg<sup>-1</sup> a 5,704 mg kg<sup>-1</sup> para los tratamientos de 10 mg L<sup>-1</sup> y 320 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. La concentración de este metal encontrada en los tallos de las plantas de alfalfa fue significativamente mayor que las concentraciones encontradas por otros investigadores en especies de plantas hyperacumuladoras de oro (6), lo cual podría explicarse por la capacidad natural de la planta para absorber oro o por las condiciones experimentales utilizadas. Las concentraciones de plata encontradas en las raíces y tallos de las plántulas de alfalfa se muestran en la Tabla 2. Las tablas 1 y 2 muestran que cuando el medio contenía 320 mg L<sup>-1</sup>, de oro o plata, la absorción y transporte de oro fue mayor, comparado con la absorción y transporte de plata. Jones y Peterson (8) encontraron que en *Lolium perenne*, la plata es retenida mayormente en las raíces; sin embargo, las concentraciones de oro y plata encontradas en los tallos de las plantas de alfalfa indican que esta especie tiene posibilidades para ser usada en la fitominería de oro y plata, si las condiciones del suelo permiten su cultivo.

**ESTUDIOS DE ABSORCIÓN DE RAYOS X (XAS):** Los espectros de absorción de rayos X en la región del umbral de ionización (XANES) [X-Ray Absorption Near Edge Structure (XANES)] del oro contenido en las raíces y tallos de las muestras de alfalfa, así como de los compuestos modelo, se muestran en la Figura 1a. La energía de absorción del oro en los tejidos de las plantas y en la muestra de agar corresponde a la energía del oro(0) (11.981 keV) y no a la energía del tetracloroaurato, que fue el compuesto utilizado en el

**Tabla 2.** Absorción y transporte de plata en plantas de alfalfa. Los datos representan el promedio de  $40 \pm 5$  plantas.

| mg kg <sup>-1</sup> en el medio | Concentración en raíces (mg kg <sup>-1</sup> ) | Error estándar | Concentración en tallos (mg kg <sup>-1</sup> ) | Error estándar |
|---------------------------------|--|----------------|--|----------------|
| Ag 40                           | 600  | 20             | 10   | 2              |
| Ag 80                           | 700  | 15             | 18   | 3              |
| Ag 160                          | 1000   | 120            | 20   | 2              |
| Ag 320                          | 2700   | 109            | 120  | 10             |

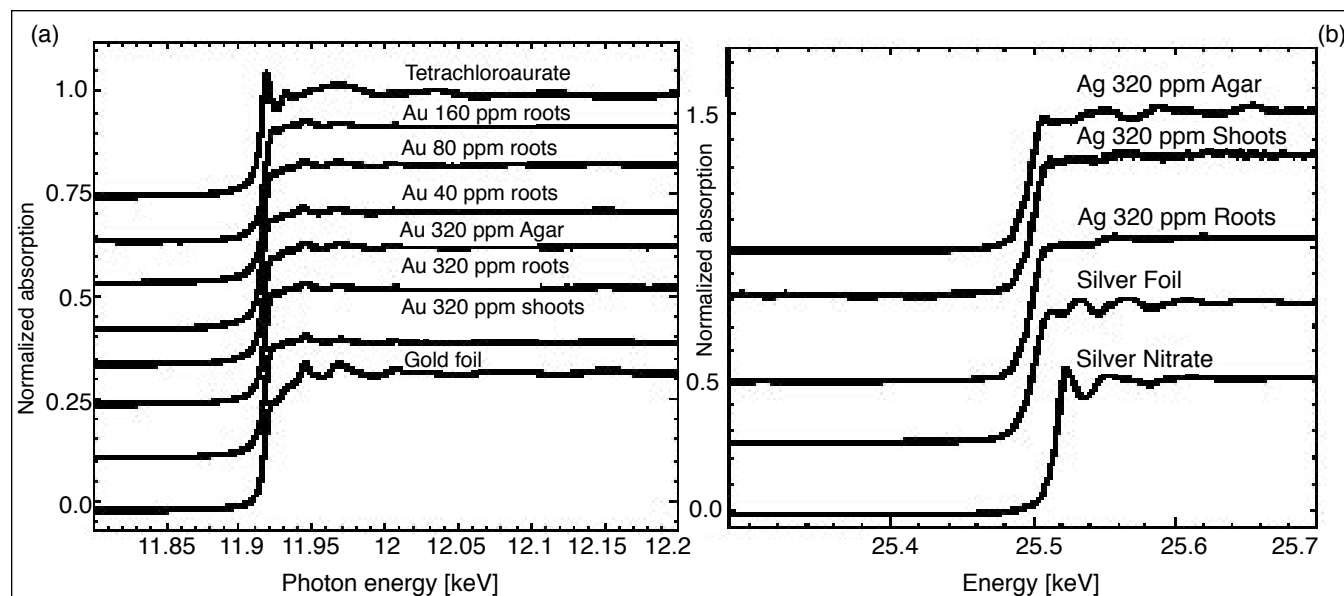
medio de cultivo (9). La Tabla 3 muestra los enlaces de los átomos de oro en cada muestra investigada, la distancia del enlace ( $R$ ) y la bondad del ajuste ( $\sigma^2$ ). Como se deduce de estos datos, el vecino más próximo en el tetrachloroaurato muestra una distancia interatómica mucho más corta que la del vecino más próximo en los átomos de oro contenido en los tejidos de la planta y el de las muestras de agar. Sin embargo, el vecino más próximo en el oro (0) (lámina de oro) se encuentra a la misma distancia que el vecino más próximo en el oro de la planta y el de la muestra de agar, lo que confirma que el oro encontrado en las plantas de alfalfa es oro(0).

La Figura 1b muestra los espectros XANES correspondientes a la plata contenida en raíces y tallos de la alfalfa, en la muestra de agar, en el compuesto ( $\text{AgNO}_3$ ) y en la lámina estándar de plata [plata (0)]. Como se observa en la figura, los espectros obtenidos de las raíces, tallos y agar son muy similares y su pico de absorción apa-

rece al mismo nivel de energía que la lámina de plata.

Los porcentajes de iones de plata en el medio de cultivo y en el tejido de la planta de alfalfa se pueden ver en la Tabla 4 que muestra que la mayoría de los iones de plata en el tejido de la planta y en el medio de cultivo se encontraban como  $\text{Ag}(0)$ , lo que indica que la planta absorbe este metal sin carga eléctrica.

ESTUDIOS DE TEM: La Figura 2a es una imagen de TEM de poca magnificación que muestra un tallo de alfalfa donde se observan nanopartículas agregadas. En esta imagen los puntos negros corresponden a las nanopartículas. En la imagen también se observa que las nanopartículas se distribuyen por zonas. La Figura 2b muestra el espectro de dispersión de energía de rayos-X (EDS) correspondiente a una nanopartícula seleccionada al azar. Este espectro confirma que la nanopartícula es de oro puro. El estudio se repitió en varias nanopartículas confirmando que todas ellas están formadas



**Figura 1**(a) XANES del oro encontrado en raíces y tallos de la alfalfa, en la muestra de agar enriquecida con oro, en la lámina de oro y en el compuesto tetrachloroaurato (7). (b) XANES de la plata encontrada en raíces y tallos de la alfalfa, en la muestra de agar enriquecida con plata, en la lámina de plata y en el compuesto nitrato de plata.

La figura demuestra que los iones de plata  $\text{Ag}^{+1}$  se reducen en el medio y como en el caso del oro, la planta los absorbe por las raíces y los transporta a los tallos como  $\text{Ag}(0)$ .

**Tabla 3.** Ajuste FEFF para el oro contenido en la planta, el agar y el compuesto de oro utilizado en el medio de cultivo

| Muestra          | Enlace | R(Å) | s <sup>2</sup> |
|------------------|--------|------|----------------|
| Tetracloroaurato | Au-Cl  | 2.28 | 0.0141         |
| Lámina de oro    | Au-Au  | 2.86 | 0.0081         |
| Au 320 Agar      | Au-Au  | 2.87 | 0.0041         |
| Au 320 raíces    | Au-Au  | 2.85 | 0.0044         |
| Au 320 tallos    | Au-Au  | 2.86 | 0.0046         |
| Au 160 raíces    | Au-Au  | 2.86 | 0.0056         |
| Au 80 raíces     | Au-Au  | 2.86 | 0.0069         |
| Au 40 raíces     | Au-Au  | 2.86 | 0.0070         |

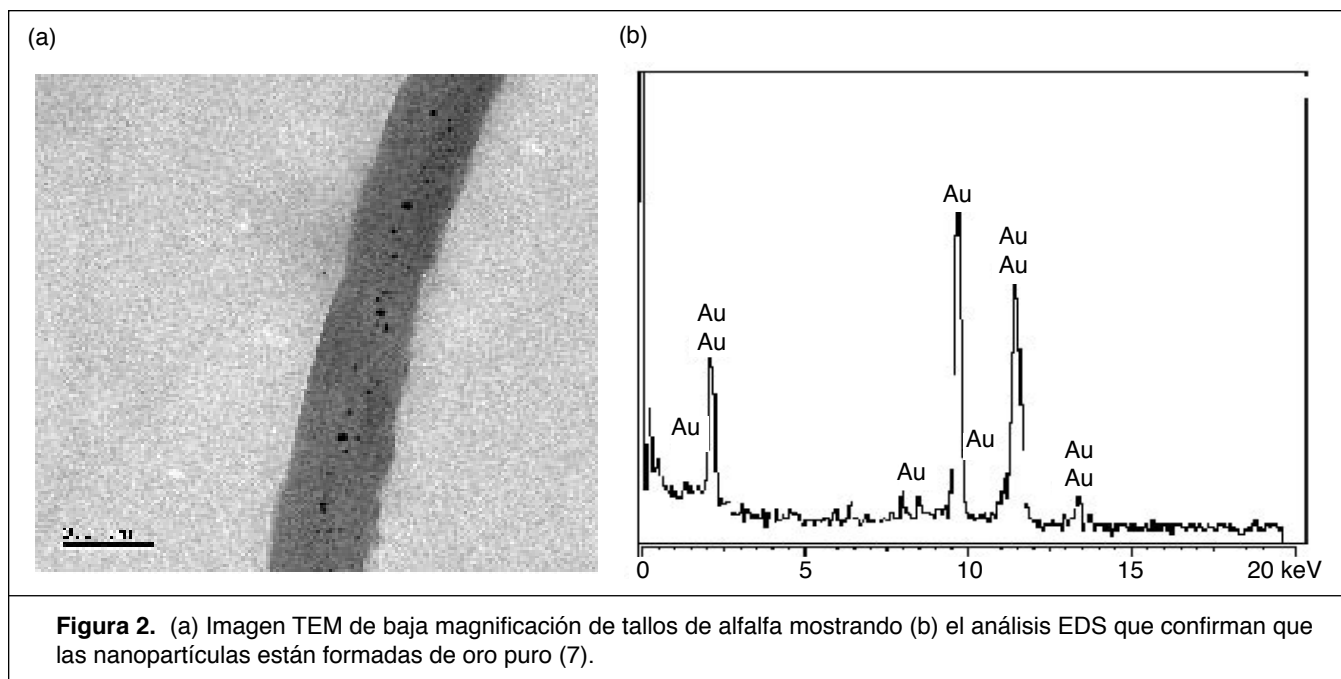
**Tabla 4.** Porcentajes de Ag (0) y Ag (I) presentes en las muestras

| Muestra       | %Ag (I) Nitrate | %Ag (0) Lámina |
|---------------|-----------------|----------------|
| Ag agar 320   | 1.5             | 98.5           |
| Ag raíces 320 | 5.1             | 94.9           |
| Ag tallos 320 | 3.3             | 96.7           |

de oro puro. Los estudios reflejaron resultados similares para el caso de la plata (datos no mostrados). Estos resultados muestran por vez primera que es posible la síntesis de puntos cuánticos en plantas vivas, y que en el futuro se pueden encontrar otros tipos de agregación de nanopartículas y obtener estructuras de valor incalculable para la ciencia.

#### Agradecimiento

Los autores agradecen el soporte económico de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) (Acuerdo S06GM8012-30) y del Centro para el Manejo de Recursos Ambientales de UTEP (CERM) a través del fondo de la Oficina para la Investigación Exploratoria de la EPA (Acuerdo Cooperativo CR-819849-01-4). Parte de esta investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Radiación Sincrotrón de la Universidad de Stanford [Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL)]. Los autores también agradecen al Gateway Program del Departamento de Energía y a la Iniciativa del Corredor de Materiales, así como al Programa del Centro para la Investigación y Políticas Ambientales del Sudoeste (SCERP). Finalmente los autores agradecen la ayuda de Mr. John Mendelhall por la preparación de las muestras de plantas utilizadas en los estudios de TEM.



## REFERENCIAS

- Roco, M.C. (1998). *J. Aerosol Sci.* **29**, 749-760.
- Rao, C. N. R., Cheetham, A. K. (2001). *J. Mater. Chem.* **11**, 2887-2894.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C. (2000). in Terry N., Bañuelos, G., *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 85-107.
- Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenov, S., Zakharova, O., Gusman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B.D., Kaskin, I. (1997) *Environm. Sci. Technol.* **31**, 860-865.
- Peralta, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K. J., Gomez. E., Arteaga, S., Rascon. E., Parsons, J. (2001). *Bull. Environ. Contam. Technol.* **66**, 727-734.
- Anderson, C.W.N., Brooks, R.R., Stewart, R.B., Simcock, R. (1998) *Nature* **395**, 553-554.
- Gardea-Torresdey, J. L., Parsons, J. G., Gomez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H. E., Santiago, P., Jose-Yacaman, M. (2002) *Nano Lett.* **2**, 397-401.
- Jones K.C., Peterson, P.J. (1986) *Plant Soil* **95**, 3-8.
- Penner-Haln, J. E. (1999) *Coord. Chem. Rev.* 190-192, 1101-1123.



# GUIDELINES FOR AUTHORS

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

- 1) Papers should be from original research and with scientific content.
- 2) Once published, articles cannot be published elsewhere in the same form, in any language, without the consent of UACJ publishers.
- 3) Papers may be: research articles, short manuscripts and invited reviews, belonging to the fields of natural or exact sciences (biology, life sciences, chemistry, mathematics, physics, etc). Final decisions concerning acceptability of the manuscripts will be made by the Editorial Board.
- 4) Papers may be written in English, Spanish or any Romance language. If a translation to Spanish is submitted, the text in original language should also be provided. Abstracts written both in Spanish and English should also be provided.
- 5) Originals are not sent back.
- 6) If the author fails to respond to the final comments of the Editorial Board of *Ciencia en la Frontera: Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ*, the journal can make editing changes which do not modify the original content of the article.
- 7) Papers should meet the following format:
  - a) Short and concise title, written in both English and Spanish or Romance languages.
  - b) A brief abstract between 40 and 150 words, which should also be written in both languages.
  - c) Name and nationality of authors.
  - d) Affiliation of authors, including highest degree and research field of all authors.
  - e) Author affiliations should be included as footnotes starting from number 1.  
Ex. Ramírez, J. L.<sup>1</sup> y Martínez, R.<sup>2</sup>  
1 Universidad de Puebla, México.  
2 Universidad de Santiago Compostela, España.  
Footnotes should be posted at the bottom left side of the page where they are mentioned.
  - f) Specify type of paper, i.e. Research article, Short manuscript or Invited Review.
  - g) Postal address of the corresponding author, which includes: telephone, fax and e-mail. Corresponding author should be highlighted with an asterisk (\*) mark.
  - h) Manuscripts should be submitted in triplicate, printed in one side only, letter or A4 size paper, double-spaced, with margins of 3 cm.
  - i) A disk copy of the manuscript in Win/Word 6.0 or higher, should also be provided. Figures and tables should be sent in Excel or WinWord 97, each saved in a different file.
  - j) For Research articles, manuscript length should be between 10 and 30 pages, plus figures and tables. Short manuscripts should be shorter than 10 pages, plus figures and tables.

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

#### BOOK REFERENCES:

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

Ex:

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

#### 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:

- Author's last name, first name(s) initial(s); other authors. (year). "Article's title". Journal abbreviation, volume, pages.

Ex:

Sagara, Y., Fernandez-Belda, F., de Meis, L. e Inesi, G. (1992). "Characterization of the inhibition of intracellular Ca<sup>2+</sup> transport ATPases by thapsigargin". J. Biol. Chem., 267, 12606-12613.

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



# NORMAS DE PUBLICACIÓN PARA COLABORADORES

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

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

palabras como mínimo y 150 palabras como máximo que deberá estar en inglés y español.

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

Ejem. Ramírez, J. L.<sup>1</sup> y Martínez, R.<sup>2</sup>

1 Universidad de Puebla, México.

2 Universidad de Santiago Compostela, España

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

- f) Naturaleza del trabajo: artículo de investigación, avance de investigación, etc.
- g) Dirección para correspondencia que incluya: teléfono, fax y correo electrónico. El nombre del autor al cual se dirigirá la correspondencia debe indicarse con un asterisco (\*).
- h) Presentar tres originales impresos en una sola cara, en papel Bond tamaño carta o A4, a doble espacio y con márgenes de 3 cm.

- i) Adjuntar el texto con una copia del trabajo en disquet, en formato Win/Word 6.0 en adelante, los cuadros y figuras en hoja de Excel o Win/Word '97 en adelante. Cada figura deberá estar grabada en un archivo individual.
- j) La extensión del trabajo deberá ser de un mínimo de 10 cuartillas de texto más las figuras, y de un máximo de 30 cuartillas más las figuras para un artículo de investigación. La extensión de los avances de investigación deberá ser de un máximo de 10 cuartillas de texto más las figuras.
- k) Las ilustraciones, cuadros y fotografías, deberán referirse dentro del texto, enumerándose en el orden que se cita en el mismo, e indicar el programa de cómputo en el que están elaborados.
- l) Los pies de figura deberán ser claros, de forma que se entiendan sin necesidad de leer el texto. Estas deberán incluirse en un listado después de la bibliografía.
- m) Las referencias bibliográficas deben asentarse de la forma convencionalmente establecida en español, es decir, indicando éstas en el cuerpo del texto con los apellidos del primer autor y año de publicación entre paréntesis, y los datos bibliográficos al final del escrito. La bibliografía se presenta al final del artículo por orden alfabético.
- n) Al citar los títulos de libro se deben utilizar mayúsculas sólo al inicio y en nombres propios.
- o) Al menos la primera vez, se deben proporcionar la equivalencia de las siglas empleadas en el texto, en la bibliografía y en los cuadros y las figuras.
- p) Distribuir los datos de las referencias bibliográficas de la siguiente manera:

REFERENCIA 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., Fernández-Belda, F., de Meis, L. e Inesi, G. (1992). "Characterization of the inhibition of intracellular Ca<sup>2+</sup> transport ATPases by thapsigargin". J. Biol. Chem., 267, 12606-12613.

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

Ciencia en la frontera:  
revista de ciencia y tecnología de la UACJ,  
se terminó de imprimir en marzo de 2004  
en los talleres de la Imprenta Universitaria,  
ubicada en Av. Plutarco Elías Calles  
y Hermanos Escobar, C.P. 32310,  
Ciudad Juárez, Chihuahua, México

Tiraje: 750 ejemplares



Ing. Rafael Vaquera  
Jefe de Servicio de Imprenta

Sr. Juvenal Rodríguez  
Jefe de taller