

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 Frago Sierra

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

Jorge Gardea Torresdey

Chemistry, UTEP, El Paso, Texas.

Armando Gómez Puyou

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

Gustavo González

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

Louis Irwin

Biological Science, UTEP, El Paso, Texas.

José Luis Ochoa

CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Esther Orozco

CINVESTAV, México, D. F.
Biomedicina Molecular.

María Jesús Perigo

Depto. de Bromatología e Inspección de Alimen-
tos, Universidad de Murcia, Murcia, España.

Gaspar Ros Berruero

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. 2, núm. 1 (diciembre 2003). Ciudad Juárez, Chih.: UACJ, 2003.

v.; 21 cm.

Seriada

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

Q4.R48 1999

505.R48 1999

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. 2, núm. 1, octubre de 2003, 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 sin permiso por escrito de *Ciencia en la frontera:* revista de ciencia y tecnología de la UACJ, véase además notas para autores.

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

CONTENIDO

Resúmenes/ <i>Abstracts</i>	5
Presentación	
Fernando Plenge Tellechea	9
<i>Los monómeros que forman los dímeros de la acetilcolinesterasa de eritrocito de ratón están glicosados de manera distinta</i>	
José Luis Gómez Olivares y Cecilio Jesús Vidal Moreno	11
<i>Modulación de la actividad de los mecanismos reguladores del pH intracelular (pHi) de linfocitos humanos, por diversas quinasas</i>	
Laura A. de la Rosa, Mercedes R. Vietes y Luis M. Botana	21
<i>Comparación de los niveles de colesterol y triglicéridos séricos en individuos con curva de glucosa oral alterada y diabéticos</i>	
Rosa M. López Durán, Alma G. Arellano Meneses y Gloria Ruiz Guzmán	29
<i>Influencia de los efectos electrostáticos en la complejación del 2-naftalensulfato por derivados de ciclodextrinas</i>	
Fernando López de las Heras, José Vázquez Tato y Emilio Álvarez Padilla	39
<i>Multiplicación in vitro del jengibre</i>	
Elda Fournier Sánchez y Marlenis Cala Cala	47
<i>Respuesta del empleo del brasinoesteroide Biobras-16 en el cultivo del tomate (Lycopersicon esculentum, Mill.) Var. "Campbell"</i>	
Alberto Fernández Turro, Salvador Batista Mejías, Luis Gustavo Moisés Medina, Elda Fournier Sánchez y C. F. Coll	51
<i>Las cactáceas de Samalayuca</i>	
Irma Delia Enríquez Anchondo	55
<i>Taxonomía, ecología y distribución de hongos macromicetos de Bosque Modelo, Chihuahua</i>	
Miroslava Quiñónez-Martínez y Fortunato Garza-Ocañas	63
<i>La promesa de los proteomas. Más allá del genoma</i>	
Joaquín Rodrigo García y Guillermo Bojórquez Rangel	71
<i>Efecto tóxico de los plaguicidas agrícolas sobre la relajación muscular. Estudio de la Ca²⁺-ATPasa de retículo sacoplásmico (SERCA)</i>	
Luis Fernando Plenge-Tellechea y Javier Vargas Medrano	75

CONTENTS

Presentation

Fernando Plenge Tellechea 9

Monomers of dimeric mouse erythrocyte acetylcholinesterase are differentially glycosylated

José Luis Gómez Olivares and Cecilio Jesús Vidal Moreno 11

Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) hydrolyzes acetylcholine and other cholinesters. AChE exist in tissue and fluid as a set of molecular forms. In mammals, there are AChE dimers that possess glycopospholipid residues for membrane attachment. Possible differences in the oligosaccharidic residues in AChE dimers and monomers from mouse erythrocytes, were analyzing their interaction with immobilized lectins. Results showed that mouse erythrocytes are rich in dimers, and differ from monomers in the sedimentation coefficient. AChE dimers migrated at 3.8S in sucrose gradient with Brij-96 or 5.1S with Triton X-100. After reduction with mercaptoethanol and iodoacetate, the separated enzyme subunits had values of 2.0S (Brij-96) or 3.2S (Triton X-100). The results confirmed that monomers remained glycopospholip residues. The binding of AChE dimers and monomers with various lectins shown that the dimers were bound to Con A (90-95%), LCA (90-95%), WGA (70-75%), RCA (25-30%) indicating that the oligosaccharides linked to AChE of mouse erythrocyte contain mannose, the fucosylation core, terminal N-acetylglucosamine and galactose or sialic acid. Moreover, some enzyme forms were devoid of terminal N-acetylglucosamine, galactose, and sialic acid because the enzyme unbound to WGA failed also in being adsorbed to RCA. As regard the association of the separated AChE subunits with lectins, we found that most of them were bound to Con A and LCA, about half to WGA (55-60%) and the few (5-10%) to RCA, and this revealed that some erythrocyte AChE dimers consisted of uneven subunits differing in the terminal sugar: subunits with and without WGA- or RCA-reactivity.

Modulation of pH regulatory mechanisms of human lymphocytes by several protein kinases

Laura A. de la Rosa, Mercedes R. Vietes and Luis M. Botana 21

Eukariotic cells regulate pHi by means of membrane-associated proteins which are ion transporters and whose activity might be regulated by several signaling pathways, including phosphorylation by kinases. In the present paper, we have studied the effect of drugs that modulate the activity of 4 kinases, on the activity of the pHi-regulating ionic transporters involved in cytosolic alkalinization, in human lymphocytes.

Colesterol and triglycerids levels from impaired glucose oral tolerance patients and diabetic patients

Rosa María López, Alma Guadalupe Arellano M. and Gloria Ruiz Guzmán 29

Diabetes mellitus is the most frequent metabolic disease in the world and in our country. It has been observed that diabetic patients have alterations in blood lipids, and so they have a higher vascular risk than non-diabetics ones. The purpose of this work was to determine if the subjects with impaired glucose tolerance also present alterations in the blood lipids in comparison with normal and diabetic people.

We made measurement of serum cholesterol, triglycerides, HDL-C and LDL-C in 131 subjects and then they were classified as normal, impaired and diabetics.

48% of the study population was normal, 37% have impaired glucose tolerance and 15% are diabetics. The 44% presented alterations in the lipid levels. The comparison between groups shown that there are not differences in the frequency of cholesterol alterations, but the triglycerides was more frequent altered in diabetics. While HDL-C was altered in impaired and diabetic patients, indicating that the subjects with impaired glucose tolerance have a different metabolic state respect with the other two groups and remark the importance of a earlier diagnostic and treatment that can delay the progression of the diabetes mellitus and reduce the associated health risks.

Influence of electrostatic interactions on the complexation of 2-naphthalen sulfonate by cyclodextrin derivatives

Fernando López de las Heras, José Vázquez Tato and Emilio Álvarez Parrilla..... 39

The electrostatic interactions effect over the complexation of the anionic guest 2-naphthalen-sulfonate by two monoamine cyclodextrin derivatives was studied. These results suggested that, depending on the position of the amino group, the electrostatic interactions between this group and the sulfonate group can show a positive or negative effect over the complex strength.

In vitro growth of ginger

Elda Fournier Sánchez and Marlenis Cala Cala 47

Ginger is an economically important product due to its numerous potential uses. The aim of the present study was to develop a new methodology which allows *in vitro* propagation of ginger, and, in this way, try to recover the agricultural tradition of Guantánamo Province, in Cuba. Basal culture medium was that from Murashige and Skoog (1962), and was supplemented with different concentrations of BAP and kinetine. The best multiplication coefficient (3.1) was obtained in the growth factor-free medium (basal culture medium). The optimal age for sub-culture planting was found between 21 and 28 days post planting, and the optimal density was of six explants per container. In summary, the present work has provided an adequate methodology for obtaining *in vitro* multiplication of a hard to culture plant, such as ginger.

Dosis response of Biobrasteroid BIOBRAS-16 in the culture of tomato (Lycopersicon esculentum, Mill.) Var. "Campbell 28". (SHORT COMMUNICATION).

Alberto Fernández Turro, Salvador Batista Mejías, Luis Gustavo Moisés Medina, Elda Fournier Sánchez and C.F. Coll51

This work was carried out in "El Resplandor", belonging to the Various-Crops Enterprise of Imías, in Guantánamo Province, Cuba. This enterprise is included within the Cuban Semi-desert (Southern coastal band) on a sandy and clayish soil, the investigation was developed from April to June, 2000, with the purpose of determining the most appropriate dose of application of brassinoesteroid (BIOBRAS-16) in order to obtain better yields in a tomato plantation *Lycopersicon esculentum, Mill.) Var. Campbell 28*. The bioactive product was sprinkled in following way 27 days after been transplanted only in the morning with the treatments of 1) witness, 2) 25 mg/ha, 3) 40mg/ha, and 4) 50 mg/ha, respectively. The measured variables were:

stem diameter, fecundation and yield. The results showed that the bioactive product was effective in all the included treatments, being treatment 4 the most effective. This sprouted a significant difference in yield in comparison to the rest of the treatments, followed by the treatment 3 and 2.

Cacti from Samalayuca, Chih., Mexico

Irma Delia Enríquez Anchondo 55

The Samalayuca Dunes Region is an endorreic basin from Chihuahuan Desert Region, located in the county of Ciudad Juarez, Chihuahua, 50 km south of the border.

This region data from ancient times, approximately 10,000 years ago.

The extension of this area is about 65,000 hectares, the sandy silique dunes are the main body, occupying an extension of 10,000 hectares.

It constitutes a very arid ecosystem, highly richness in endemisms and interesting biodiversity in both flora and wildlife.

Cacti plants are abundant, at this time were found 16 species within 5 genera, 3 tribes and 3 subfamilies, where the most abundant is cactoideae subfamily.

Some of this species are in special status for Mexico, Texas and New Mexico.

The Samalayuca and Presidio sierras, are the most important habitat for these plants in the area.

Because of the intense human activities in this zone, plants like cacti are in serious risk to be destroyed so we want to take care at this time in order to learn more about them to preserve and to conserve our biological resources.

Ecology and economic importance of macroscopic mushrooms from the Sierra Madre Occidental of Chihuahua, México

Miroslava Quiñónez-Martínez and Fortunato Garza-Ocañas 63

The Sierra Madre Occidental of Chihuahua, Mexico, contains a considerable diversity of macroscopic mushrooms with different characteristics and attributes. Some of these characteristics include parasitic and symbiotic life forms. The lack of studies in the area was one of the reasons for this study. The macroscopic mushrooms represent an important component of the forest ecosystem and therefore, it is important to have an inventory of the number and characteristics of the different species, their attributes and spatial distribution. The results will lead to a better understanding and developing of future studies on mushroom ecology and economic importance of the species found. This study will also contribute to a general perception of the mycology of the Sierra Madre Occidental, the association between mushrooms and different plant species, and the economic potential of edible mushrooms. Edible species represent a good alternative of diversification and economic return for rural communities within the region. In general the inventory, understanding and conservation of macroscopic mushrooms represent an excellent alternative for conservation of the forest resources.

Proteomics. Beyond the genome

Joaquín Rodrigo García and Guillermo Bojórquez Rangel 71

During the last twenty years, researchers all over the world have focused their work on determining the approximately three thousand millions of base pairs that structure the human genome under one of the most ambitious international research project: The Human Genome project. It is arriving to its end and new interrogates have appeared. This has created new research fields and one of them is the Proteomic. This term appeared from the concepts of proteins and genome and intends to recognize the functions of every identified gene product, the proteins. To do that there are some technological tools that are being developed, which can accomplish these objectives and in the

next fifteen years can be helpful as diagnostic tools in some diseases. Proteomic will have an impact in the understanding of physiopathology, creation of new drugs and in the production of vaccines. Nowadays, there is a great investment from many laboratories to obtain the technology to reach these goals.

Toxic effect of pesticides on muscle relaxation. Studies on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA)

Luis Fernando Plengue-Tellechea and Javier Vargas Medrano 75

Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) is a membrane protein, and thus, its activity may be modulated by membrane lipids. This is a protein that uses ATP hydrolysis to pump cytosolic Ca²⁺ into the sarcoplasmic reticulum (SR) stores, maintaining cytosolic Ca²⁺ concentration low, and playing a crucial role in muscle contraction and relaxation. SR membranes are simple membrane models, therefore attractive to study of the effect of physiologically-active compounds on the Ca²⁺ homeostasis of skeletal muscle.

These studies will be carried out in SERCA-enriched SR-membranes, isolated from rat skeletal muscle; and will be focused on the actions of commonly used pesticides. In this way, we hope to improve the treatment and management that the health department makes of occupational or accidental intoxications.

Presentación

Luis Fernando Plenge Tellechea
Coordinador

Cuando se habla de *ciencia* en los tiempos actuales se muestra el largo camino que nos queda por recorrer. El científico de origen francés Luis Pasteur, es autor de un proverbio que dice: “la suerte favorece a las mentes preparadas”. Sin duda, él experimentó en su vida que la formación es un proceso vital para el desarrollo de las ciencias en un país.

En nuestra región fronteriza hay un gran potencial de recursos naturales qué estudiar, problemas ambientales y de salud. México es un país donde la sobreexplotación de los recursos y la marginación de la sociedad han creado una serie de necesidades tanto socioeconómicas como de salud.

En este volumen, hemos incluido una nueva variante: que los tomos de la revista ya no serán de temas exclusivos sino de temas libres de investigación en las áreas de Ciencias Naturales y Exactas, lo cual sin duda, fortalecerá este medio científico de comunicación. Es por ello, que en este volumen le presentamos temas de vanguardia como lo son las áreas de salud, ecología y biodiversidad. Incluimos tanto artículos de origen regional, nacional, como del extranjero. Lo importante de estos artículos es que no muestran sólo un contenido teórico, sino que se incluyen en su mayoría temas de nuevos resultados experimentales, por lo que nuestra revista viene cumpliendo uno de sus principales objetivos: ser un medio de difusión científica de calidad para la región y el país. La tarea no ha sido fácil, pero conjuntado los esfuerzos de quienes se han motivado a la tarea de sacar adelante este volumen, lo ven realizado.

Nuestro Instituto se ve fortalecido con el programa de esta revista debido a la calidad de los artículos incluidos en este volumen. Prueba de ello es el prestigio académico de los miembros del Consejo Editorial Internacional, que sin duda, cuenta con académicos investigadores muy reconocidos, ello con el acumulado currículo que los avala en un trayecto de largos años en el camino de las ciencias en México y el extranjero.

Estos temas de investigación incluyen aspectos de salud como neuroquímica, que involucra la investigación de la enzima acetilcolinesterasa, la cual es vital en el proceso de neurotransmisión. Esta enzima es muy estudiada en aspectos relacionados con agentes tóxicos externos en los

organismos, por ejemplo con la intoxicación causada por plaguicidas y veneno de serpientes.

Otros temas importantes en el área de salud son la cuantificación del pH intracelular, necesario para detectar cambios metabólicos dentro de la célula y por ende, de los tejidos corporales; estudios relacionados con la diabetes, un problema serio de salud pública en nuestra región fronteriza. Además, se incluyen temas de frontera como los proteomas, relacionados con las proteínas expresadas por el genoma humano, como el estudio de las proteínas puede implicar la solución de problemas de salud como el cáncer y diabetes; también incluimos temas sobre la aplicación de ciclodextrinas, carbohidratos cíclicos de origen natural, las cuales se relacionan con áreas tan diversas como la contaminación y los alimentos; estudios de los efectos causados por plaguicidas sobre la regulación celular de calcio en el músculo, lo cual es vital, como ejemplo para estudiar su afección sobre el fenómeno de la contracción muscular. También incluimos temas de agronomía; de ecología de nuestra región, como son los estudios de vegetación y de biodiversidad.

Sin duda, el presente tomo abarca un amplio margen de la ciencia. Repito una frase que mencioné en el volumen anterior: la ciencia es única, no podemos reducirla a los términos de básica y aplicada, “por tanto, no me explico cómo hay una ciencia aplicada que no sea básica y una básica sin aplicar, ambas van de la mano, ya que buscan descubrir y solucionar un bien común”. Ahora incluyo el bien común: buscar el bienestar del hombre, no lo contrario, que genera la división.

¡Muchas gracias a Dios y a todos por la realización de este volumen!



LOS MONÓMEROS QUE FORMAN LOS DÍMEROS DE

La acetilcolinesterasa de eritrocito de ratón están glicosilados de manera distinta

José Luis Gómez Olivares* y Cecilio Jesús Vidal Moreno**

La acetilcolinesterasa (AChE, 3.1.1.7) hidroliza acetilcolina y otros ésteres de colina. En tejidos y fluidos corporales, la AChE existe como un conjunto de formas moleculares. En mamíferos, los dímeros y monómeros de AChE poseen un dominio glicofosfatidilinositol para anclarse a las membranas. Las diferencias posibles en los residuos de oligosacáridos enlazados a dímeros y monómeros se analizaron por su interacción con lectinas inmovilizadas. Los resultados mostraron que los eritrocitos de ratón están enriquecidos en dímeros, que difieren de los monómeros por su coeficiente de sedimentación. Los dímeros de AChE migraron a 3.8S en gradientes de sacarosa con Brij96 o 5.1S con Triton X-100. Las subunidades separadas por la reducción con mercaptoetanol y iodoaceto, tuvieron valores de 2.0S (Brij-96) o 3.4S (Triton X-100). Los resultados confirmaron que los monómeros mantienen el anclaje glicofosfatidilinositol. La interacción de los monómeros y dímeros con distintas lectinas, mostró que los dímeros se unieron a Con A (90-95%), LCA (90-95%) WGA (70-75%) RCA (25-30%), señalando que los oligosacáridos ligados a la AChE contienen manosa, fucosa, N-acetilglucosamina y galactosa o ácido siálico. Aunque, algunas formas enzimáticas estuvieron desprovistas de N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico, debido a que hubo enzimas que no se absorbieron a WGA ni a RCA. Teniendo en cuenta, la asociación de las subunidades de AChE separadas, encontramos que la mayoría de ellas se unieron a Con A y LCA, casi la mitad a WGA (55-60%) y pocas (5-10%) a RCA, y esto reveló que algunos dímeros de AChE en eritrocitos están constituidos de algunas subunidades que difirieron en el azúcar terminal: subunidades que interaccionan con o sin WGA- o RCA-

INTRODUCCIÓN

La acetilcolinesterasa (AChE, EC. 3.1.1.7) cumple su papel fisiológico principal en la transmisión colinérgica al hidrolizar de manera eficaz al neurotransmisor, acetilcolina (ACh), produciendo acetato y colina. La AChE se considera una enzima casi perfecta, debido a que su capacidad catalítica está en el límite de la difusión. Unas 25,000 moléculas de ACh se transforman en cada sitio activo por segundo (Massoulié y col., 1993).

La acetilcolinesterasa se presenta en seis tipos estructurales de asociación cuaternaria, que se generan por un procesamiento alternativo del ARN mensajero. Se han establecido dos tipos de formas moleculares: las globulares (G) que pueden ser monómeros, dímeros y tetrámeros (G_1 , G_2 y G_4) de la subunidad catalítica de unos 75-kDa, mientras que las formas asimétricas (A) contienen uno, dos o tres tetrámeros (A_4 , A_8 y A_{12}) asocia-

dos a una subunidad estructural o tallo de naturaleza semejante al colágeno. El subíndice señala el número de subunidades catalíticas en cada molécula. Además, entre ellas se distinguen por su solubilidad, interacciones iónicas o hidrofóbicas, parámetros hidrodinámicos y dotación de carbohidratos.

Las formas globulares de la AChE son un grupo heterogéneo y pueden agruparse entre moléculas anfifílicas (G^A) e hidrofílicas (G^H). Estas últimas, también se conocen como no anfifílicas (G^{NA}). Las formas G^A poseen un dominio hidrofóbico que las ancla a las membranas y permite su asociación con detergentes.

Los monómeros (G_1), dímeros (G_2) y tetrámeros (G_4) difieren en el coeficiente de sedimentación (en unidades Svedberg) (4-5S, 6-7S y 9-11S, respectivamente). El aumento del coeficiente de sedimentación de la proteína dependerá del tamaño de la subunidad estructural.

Se ha demostrado la interacción enzima-fosfolípido o enzi-

* Doctor en Biología, especialidad en Bioquímica y Biología Molecular, Laboratorio de Biomembranas. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. Rafael Atlixco núm. 186. Col. Vicentina. C.P. 09340. Apartado Postal. 55-535. Distrito Federal. México. Correo electrónico: gool@xanum.uam.mx

** Doctor en Bioquímica. Grupo de Neuropatología de los Sistemas Colinérgicos. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular –A. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus Espinardo. C.P. 30100. Murcia, España. Correo electrónico: cevidal@um.es

ma-detergente por análisis de sedimentación, cromatografía de exclusión molecular y electroforesis de cambio de carga de las micelas. La formación de complejos enzima-detergente modifica el coeficiente de sedimentación de la proteína, en mayor o menor medida, según las propiedades micelares del detergente. También, se altera el radio de Stokes (sobre 1 nm) y la migración electroforética (Bon y col., 1988; García-Ayllón, 1999).

La mayoría de los tejidos y medios biológicos de todos los vertebrados contienen AChE, aunque las proporciones dependen del tejido y de la especie animal que se considere (Chatonnet y Lockridge, 1989). En los mamíferos, la AChE se localiza sobre todo en los tejidos excitables, nervios y músculos (Marnay y Nachmansohn, 1938).

En aquellos tejidos desprovistos de ésteres de colina, se ha sugerido que estas enzimas realizan otras funciones, no relacionadas con la transmisión sináptica. Algunos datos indican que la AChE tiene actividad peptidásica. Se ha determinado que son capaces de hidrolizar sustratos extraños que no tienen un significado fisiológico específico, como por ejemplo, la aspirina y sus derivados neutros. La AChE actúa sobre encefalinas y sus precursores. Por tal capacidad, se ha propuesto que participan en la maduración y degradación de neuropéptidos (Masson y col., 1998).

a) La actividad AChE en las células sanguíneas

Los eritrocitos, linfocitos, megacariocitos y plaquetas poseen actividad AChE (Bartha y col., 1987; Richier y col., 1992; Soreq y col., 1994; Marcos y col., 1998), esto representa un enigma acerca de un posible papel fisiológico en estas células.

Las plaquetas proceden de los megacariocitos y ambos tipos celulares muestran actividad AChE. Cuando a cultivos de megacariocitos se adicionan algunos análogos de ACh e inhibidores de las colinesterasas (ChEs) se favorece la megacariopoyesis (Burstein y col., 1980).

b) Estructura química de los dímeros de AChE

Los dímeros hidrofóbicos (G_2^A) de la AChE de diversos tejidos y especies están conformados por monómeros que se mantienen unidos mediante puentes disulfuro intercaternarios. Ambos monómeros están anclados a la membrana plasmática por un enlace amida entre el extremo C-terminal de la subunidad catalítica y la etanolamina, que a su vez se liga a una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Massoulié y col., 1993).

A este tipo de estructuras se les denomina formas anfífilas G_2 Tipo I y se han encontrado en eritrocito de mamífero, órgano eléctrico de *Torpedo*, músculo de *Xenopus*, riñón, hígado y timo de rata, músculo esquelético y cardíaco de ratón (Futerman y col., 1983; García y col., 1988; Gómez, y col., 1999; Roberts y Rosenberry, 1985). También, se ha descrito que hay monómeros anclados por GPI en células tumorales humanas (Sáez-Valero y Vidal, 1995). Esta clase de monómeros abunda en larvas de *Drosophila*, y tal vez representen formas enzimáticas primitivas (Arpagaus y col., 1998).

c) La glicosilación de la acetilcolinesterasa

La estructura primaria de las subunidades de la AChE contiene varias secuencias consenso para adicionar oligosacáridos en residuos de asparagina (Asn) (sitios potenciales de N-glicosilación), cuyo número depende del organismo y del tejido considerado. La AChE de suero fetal bovino contiene 5 sitios potenciales de N-glicosilación (Doctor y col., 1990; Prody y col., 1987). La AChE humana contiene tres secuencias de N-glicosilación (N^{265} , N^{350} y N^{464}), y por estudios de mutagénesis, se ha observado que la eliminación progresiva afecta gradualmente a la biosíntesis y secreción de la enzima, pero no altera su actividad (Velan y col., 1993). Sin embargo, en cultivos de células de pollo, la adición de tunicamicina impide la N-glicosilación y suprime completamente la producción de AChE activa, pero no la síntesis.

Por experimentos de unión a lectinas se puede comprobar que las ChEs extraídas de diferentes tejidos de organismos de la misma especie presentan pautas de glicosilación específica, una propiedad que puede ser demostrada por electroforesis desnaturizante con SDS y no desnaturizante, así como por la interacción con anticuerpos. Por ejemplo, los eritrocitos y linfocitos de bovino poseen AChE en su membrana, y aunque las enzimas de los dos tipos celulares poseen la misma secuencia de aminoácidos y propiedades hidrodinámicas, difieren en su interacción con lectinas (Meflah y col., 1984). En el órgano eléctrico de *Torpedo*, las formas dimericas y asimétricas se distinguen por su interacción con el anticuerpo anti-carbohidrato Elec-39 (Bon y col., 1987). Esto parece indicar que, aunque están expuestas en la superficie celular, ambas moléculas sufren diferentes procesos de maduración.

El propósito de este estudio fue investigar en eritrocitos de ratón, las posibles diferencias en los oligosacáridos unidos a las subunidades de AChE entre los dímeros y las subunidades monoméricas que los constituyen, a través de su interacción con diversas lectinas inmovilizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico, o en su defecto, del mayor grado de pureza. En ocasiones, los reactivos se disolvieron en agua Milli-RX; purificada por electrodesionización, sistema RX, grado analítico tipo II. Cuando fue necesario, los reactivos se prepararon con agua Milli-Q Plus, tipo 1, grado reactivo.

Los siguientes productos fueron de Sigma-Aldrich (España): Sepharose-4B, las lectinas inmovilizadas de *Canavalina ensiformis* (Con A-Sepharose), *Lens culinaris* (LCA-Sepharose), *Triticum vulgare* (WGA-agarosa) y *Ricinus communis* (RCA-Sepharose), ácido iodoacético, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), acetiltiolcolina (ATCh), tetraisopropilpirofosfaramida (Iso-OMPA), sacarosa, cloruro de sodio (NaCl), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido

etilenglicol-bis-(aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido N(2-hidroximetil) piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), inhibidores de proteasas (bacitracina, benzamidina, pepstatina, leupeptina, inhibidor de tripsina de soja y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)), polixietilén-10-oleil-éter (Brij 96), las enzimas catalasa de hígado bovino y fosfatasa alcalina de intestino bovino. La casa comercial Merck (España) suministró el Triton X-100 (TX-100), b-mercaptoetanol se adquirió de Acros (España).

a) Obtención de las membranas de eritrocito de ratón

Los ratones 129B6F₁/J se obtuvieron del Jackson Memorial Laboratory (Bar Harbor, EU), que suministró las parejas reproductoras. Se emplearon ratones de 16-20 semanas de edad. Tras anestesiarse a varios ratones con vapores de éter etílico, en cámara fría a 4°C, se les extrajo la sangre (alrededor de 1 ml/ratón) por punción cardiaca con una jeringa previamente humedecida con una disolución anticoagulante (NaCl 154 mM y EDTA 5.4 mM, pH 7.5).

Las células sanguíneas se separaron por centrifugación a 1000 X g en centrifuga analítica durante 10 minutos y se lavaron tres veces con sucesivos volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos (5 mM, NaCl 154 mM y EDTA 5.4 mM pH 7.5), sedimentando las células por centrifugación como antes. Después del primer lavado, se eliminaron los glóbulos blancos para descartar proteasas.

Después, los eritrocitos se lisaron con 20 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos 5 mM pH 7.5, por cada volumen original de sangre. Tras una agitación vigorosa y en frío, 10-15 minutos a 4°C. Para coleccionar las membranas eritrocitarias rotas, la suspensión se centrifugó a 100,000 g durante 30 minutos a 4°C. La fracción membranosa se lavó dos veces con la misma solución amortiguadora anterior, para eliminar la hemoglobina y residuos de plasma.

La AChE se extrajo por resuspensión de las membranas sedimentadas en solución de extracción con Triton X-100 (Hepes 15 mM; NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM a pH 7.5 y TX-100 1%), y para evitar la proteólisis se incluyeron las antiproteasas; EGTA 5mM, EDTA 3mM, bacitracina 1mg/ml, benzamidina 1 mM, pepstatina 10 mg/ml, leupeptina 20 mg/ml, inhibidor de tripsina de soja 0,1 mg/ml y PMSF 125 mM. La mezcla se mantuvo en agitación toda la noche a 4°C. Finalmente, la AChE solubilizada con Triton X-100 se recogió por centrifugación a 100,000 X g, 1 h a 4°C.

b) Medida actividad acetilcolinesterásica

La actividad AChE se midió en espectrofotómetro por el método de Ellman y colaboradores (1961), con ATCh como sustrato (1 mM) y con Iso-OMPA (50 mM), el inhibidor de la butirilcolinesterasa (BuChE). Una unidad de actividad AChE representa el contenido de enzima que hidroliza 1 mM de sustrato por hora a 37°C.

En los análisis de sedimentación, se empleó un microensayo

para medir la actividad AChE en las fracciones del gradiente. En este caso, la actividad se expresa en unidades arbitrarias, de modo que cada unidad representa el aumento de 0.001 unidades de absorbancia por ml de muestra y por minuto.

c) Conversión de los dímeros de AChE en monómeros

Los extractos solubles de las membranas de los eritrocitos con Triton X-100 (que sólo contenía dímeros anfífilicos de AChE) se sometieron a un tratamiento reductor con b-mercaptoetanol (14 mM), en agitación constante durante 40 min a 25°C. Inmediatamente, se realizó la alquilación con iodoacetato de sodio (140 mM). Para ello, se añadió el reactivo a la muestra, se ajustó el pH 8.5, y la mezcla se incubó en agitación 40 min a 25°C en la oscuridad. Se eliminó el exceso de reactivos por filtración en tubos Ultrafree-15 (Millipore, EU).

d) Interacción de las formas moleculares de AChE con lectinas

A las muestras (0.5-1.0 ml), que contenían dímeros o monómeros aislados, se añadió 0.25-0.5 ml de Sepharose-4B en suspensión (prueba control), Con A-Sepharose, LCA-Sepharose, WGA-agarosa o RCA-agarosa. Las mezclas se incubaron 16 h en agitación constante a 4°C.

Durante la incubación, la lectina se une a las glicoproteínas formando complejos de gel/lectina/proteína. La enzima libre se separó de la unida a la lectina por centrifugación a 5,000 X g, durante 10 min a 4°C en una microfuga (Beckman, EU). Se coleccionaron 450-900 ml del sobrenadante, evitando tomar las bolitas con enzima ligada. A continuación, en los sobrenadantes se valoró la actividad AChE (por el método de microplaca), y ese valor se corroboró con la actividad AChE medida en los perfiles de sedimentación de las muestras con la enzima no ligada.

Los resultados se expresaron como porcentajes de la actividad AChE retenida por cada lectina en particular, respecto a la del sobrenadante del ensayo control (muestra incubada con Sepharose-4B sin lectina).

e) Preparación de los gradientes densidad de sacarosa

Los gradientes continuos de densidad de sacarosa se elaboraron a partir de dos disoluciones de sacarosa de diferente concentración (5% y 20% p/v), preparadas en solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, pH 7.0, con NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM y Triton X-100 (0.5%), que en ocasiones fue sustituido por Brij-96 (0.5% p/v).

Para formar el gradiente se empleó un sistema de vasos comunicantes (Kontron, España). En cada vaso se depositaron 5 ml de cada una de las disoluciones de partida. El vaso que contenía la sacarosa concentrada presentaba en su base una salida que se conectaba a un tubo de goma, que se ajustaba a una bomba peristáltica (Gilson, Francia), y cuyo extremo final desembocaba en el tubo de centrifuga de polialómero

(Beckman, EU) de 12 ml de capacidad. Al abrir la llave que comunicaba ambos vasos, se accionaba el funcionamiento de la bomba peristáltica. El gradiente se formaba a medida que pasaba la disolución diluida hacia el vaso de la concentrada. El flujo de salida se controlaba con la bomba peristáltica.

La centrifugación de las muestras en gradientes con sacarina y Brij 96, o Triton X-100, sirvió para separar e identificar las formas moleculares y obtener una primera información acerca del carácter hidrofílico o hidrofóbico de las mismas.

Para conocer el coeficiente de sedimentación de cada forma molecular de la AChE, se usaron proteínas estándares de coeficiente de sedimentación conocido: catalasa de hígado bovino (11.4S) y fosfatasa de intestino bovino (6.1S). Una vez depositado un volumen de muestra (0.3-1.0 ml) sobre la superficie de los gradientes, se centrifugaron los tubos a $165,000 \times g_{av}$ durante 18 h a 4°C, en un rotor basculante SW41Ti (Beckman, EU).

Luego, los tubos se perforaron cuidadosamente por su base y se recogieron fracciones con una bomba peristáltica (Gilson, Francia) y un colector de fracciones (Farmacia, EU). Por cada tubo de 12 ml, se obtenían 40-42 fracciones de unos 260 ml que se almacenaban a -20°C hasta el momento de valorar la actividad acetilcolinesterásica en cada fracción.

f) Medida de actividad de las enzimas marcadoras

La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno, dando agua y oxígeno molecular. El H_2O_2 absorbe en la región del ultravioleta a 240 nm ($\epsilon = 41 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Poco antes de valorar la actividad de esta enzima, se preparó un medio de reacción que contenía peróxido de hidrógeno 18 mM en solución amortiguadora de fosfato 50 mM, pH 7.0. En una cubeta de cuarzo se añadían; 1 ml de medio de reacción y 5-10 ml de muestra, se agitaba y se medía la disminución de absorbancia a 240 nm en un espectrofotómetro modelo Uvikon 930 (Kontron, España) a temperatura ambiente (Chance y Herbert, 1950).

La fosfatasa alcalina hidroliza el p-nitrofenilfosfato (pNPP), a pH alcalino, para generar fosfato y p-nitrofenol, que absorbe a 405 nm ($\epsilon = 18,2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción con pNPP 0.75 mM, se preparó mezclando 200 ml de pNPP 38 mM con 10 ml de tampón dietanolamina 100 mM, pH 9.8. La medida de la actividad se realizó en placas de microvaloración (Nunc, EU), empleando el modo dual de longitud de onda, 405 nm y 620 nm, para medir el incremento de absorbancia ($A_{405} - A_{620}$) en cada uno de los pocillos, que contenían la mezcla de reacción (250 ml) y la muestra (10 ml) (Garen y Levinthal, 1960).

g) Cálculo del coeficiente de sedimentación

Una vez determinadas la actividad AChE y la de las enzimas de referencia, se calculó el coeficiente de sedimentación de las formas moleculares de la AChE (Martin y Ames, 1961), expresado en unidades Svedberg (S). El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$S_{\text{proteína problema}} = \frac{(N_t - N_p)}{(N_t - N_e)} \times S$$

20, w proteína estándar

Donde N_t correspondió al número total de fracciones recogidas del gradiente, N_p fue la fracción en la que la actividad de la forma molecular de AChE fue máxima y N_e fue la fracción con la mayor actividad de la proteína de referencia. En cada caso se eligió la proteína estándar que estuviese más próxima en el gradiente a la forma molecular cuyo coeficiente de sedimentación se deseaba conocer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Solubilización de los dímeros y conversión en monómeros

Las células sanguíneas de mamífero son ricas en AChE unida a su membrana plasmática y al igual que en otros tejidos, requiere de detergentes para su solubilización, la interacción con éstos demuestra sus propiedades hidrofóbicas.

En este caso, con el uso del TX-100 se consiguió solubilizar el 80% de la AChE de la membrana de los eritrocitos. En la Tabla 1, se muestra la actividad específica estimada en los eritrocitos de ratón. Cabe señalar que este valor fue mayor a la actividad AChE determinada en otros tejidos (plasma, corazón e hígado) del mismo animal (García-Ayllón y col., 1999; Gómez y col., 1999 y 2000).

TABLA 1. Actividad AChE solubilizada de eritrocitos de ratón. La actividad AChE se determinó en espectrofotómetro, empleando 25 ml de muestra. Cada unidad de actividad AChE representa la cantidad de enzima que hidroliza un μmol de ATCh por hora a 37°C (AE). Las medidas se realizaron por triplicado. Los resultados muestran los valores promedio y la desviación estándar de 11 preparaciones con eritrocitos de ratón.

Actividad solubilizada (U/ml)	Contenido de proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
5.96 ± 0.70	3.35 ± 1.23	1.95 ± 0.51

Los detergentes no iónicos a veces pueden modificar la capacidad de unión o las propiedades cinéticas de receptores y enzimas (McIntosh y Davidson, 1984). En este sentido, Moore y col. (1989) observaron que, a bajas concentraciones (0.05-0.25% v/v), el TX-100 reducía la actividad AChE de eritrocito humano, lo que no ocurría a concentraciones superiores. El efecto inhibitorio del TX-100 a bajas concentraciones podría deberse a la modificación de las interacciones lípido-proteína y/o proteína-proteína. En cambio, a mayores concentraciones se favorece la formación de micelas detergente-membrana. A lo largo de este trabajo, no se observaron cambios en la actividad de la enzima solubilizada con TX-100 (1% v/v).

TABLA 2. Coeficientes de sedimentación de las formas moleculares de la AChE en eritrocito de ratón. Los valores promedios y desviaciones estándares de los coeficientes de sedimentación de las formas nativas G_2^A de AChE y de los monómeros obtenidos por reducción de los puentes disulfuro y alquilación de los grupos tioles libres. La migración de las moléculas enzimáticas dependió del detergente añadido, lo que prueba sus propiedades anfifílicas. Los análisis se hicieron en gradientes de sacarosa (5-20%) con Brij-96 o Triton X-100. El número de experimentos se señala entre paréntesis.

Detergente	Forma G_2^A	Forma G_1^A
Brij-96	$3.8 \pm 0.3S$ (12)	$2.0 \pm 0.3S$ (3)
Triton X-100	$5.1 \pm 0.1S$ (6)	$3.4 \pm 0.2S$ (8)

El análisis de las formas moleculares existentes de AChE en eritrocito, mediante gradientes de centrifugación diferencial mostró que en los eritrocitos de ratón, la enzima se presenta sólo como homodímeros (formas G_2^A) anclados a la membrana por unidades GFI (Figura 1).

La asociación de los dímeros hidrofóbicos de AChE con la membrana plasmática, a través del anclaje GFI no es exclusiva de los eritrocitos de mamífero. También, se han determinado en músculo cardíaco humano (González y col., 1991), ratón (Gómez y col., 1999) y en ciertos tumores (Sáez-Valero y col., 1995). También, se han hallado en el sistema nervioso central de *Drosophila* (Haas y col., 1988), y en el órgano eléctrico y músculo esquelético de *Torpedo* (Bon y col., 1988). Aunque, la estructura básica del GFI se mantiene (Low, 1989), las proteínas de algunas células muestran cambios estructurales en este dominio.

Los resultados de la Tabla 2 y de la Figura 1 prueban la conducta anfifílica de los dímeros de AChE de los eritrocitos, pues su coeficiente de sedimentación varió con el detergente añadido a los gradientes (5.1S en Triton X-100 y 3.8S en Brij 96). Skau (1985) determinó que los dímeros de AChE de los eritrocitos de ratones ReJ 129 o C57BL/6J migraban a 6.5S en gradientes de sacarosa sin detergente. La migración de la enzima a zonas más densas de sacarosa, en ausencia de detergentes, se debe a la autoagregación propia de las moléculas anfifílicas. Los detergentes empleados evitaron la agregación de la AChE, aunque las micelas Brij-AChE y Triton X-100-AChE difieren en su conducta hidrodinámica.

En la Figura 2 se muestra la conversión de los dímeros de AChE en monómeros después de la reducción de los puentes disulfuro intercatenarios. Alrededor del 70% de los dímeros de AChE se convirtieron en monómeros por la reducción de los enlaces disulfuro con b-mercaptoetanol y alquilación de los grupos tioles libres con iodoacetato. Tras repetir el protocolo, se consiguió separar

los dímeros que permanecieron unidos después del primer tratamiento.

Los monómeros globulares de AChE (G_1^A), generados a partir de los dímeros nativos (G_2^A), mostraron coeficientes de sedimentación de $2.0 \pm 0.3S$ o $3.4 \pm 0.2S$ en gradientes con Brij 96 o Triton X-100, respectivamente (Figura 1 y Tabla 2). Este comportamiento hidrodinámico según el detergente añadido al gradiente, demuestra que las subunidades monoméricas mantienen el anclaje GFI después de alquilar-reducir los puentes disulfuro.

Los dímeros difieren de los monómeros en el coeficiente de sedimentación: 5.1S y 3.4S en TX-100, estos valores concuerdan con los descritos para las mismas formas moleculares en eritrocito humano (Ott y col., 1982).

Es interesante señalar que la separación de subunidades de AChE del eritrocito humano es más fácil que con la ligada a la membrana (Ott y col., 1982). Esto sugiere que el microambiente lipídico protege a la enzima, pues restringe el acceso del agente reductor a los enlaces disulfuro intercatenarios. Como también dificulta la ruptura de los enlaces disulfuro intracatenarios, disminuye la pérdida de la estructura terciaria de la subunidad y por lo tanto, la inactivación de la enzima.

La estructura de los dímeros de AChE en eritrocito de ratón parece ser diferente de la de las isoformas de *Electrophorus*

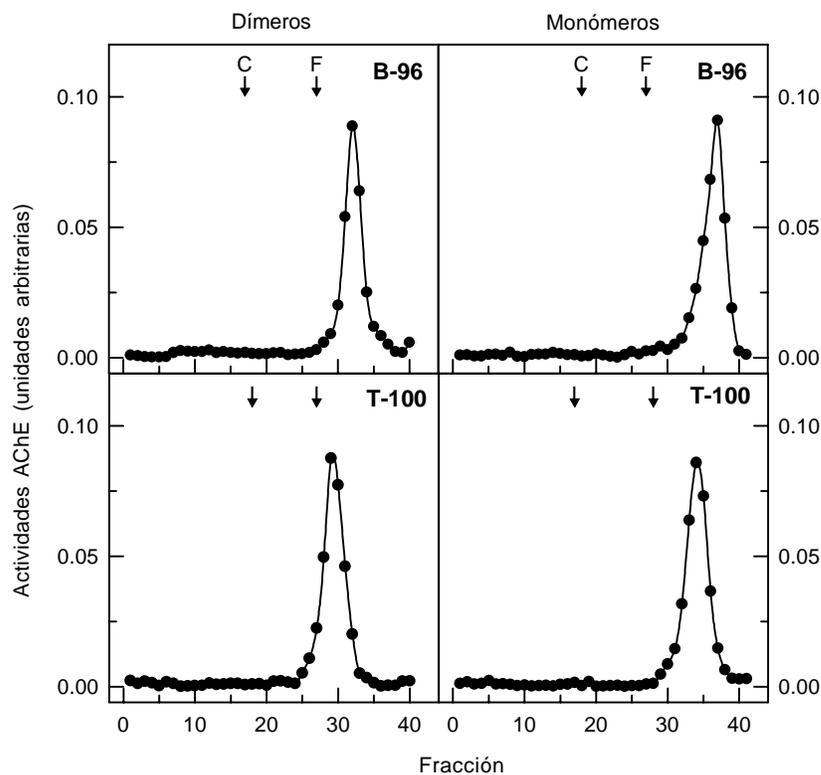


FIGURA 1. Comportamiento hidrodinámico de las formas de AChE de eritrocito de ratón. Las fracciones ricas en dímeros o monómeros de AChE se aplicaron sobre gradientes de sacarosa con Triton X-100 (T-100) o Brij 96 (B-96). La actividad AChE se determinó por el método de microplaca. Note que la migración de ambas formas enzimáticas varía con el detergente empleado. Los marcadores de sedimentación fueron: catalasa (C) (11.4S) y fosfatasa alcalina (F) (6.1S).

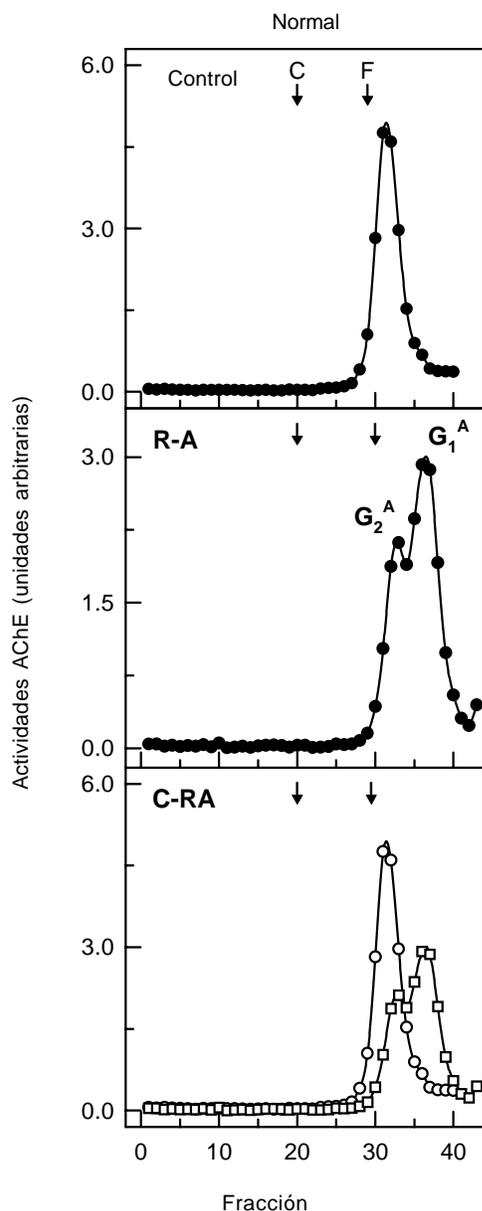


FIGURA 2. Transformación de los dímeros de AChE en monómeros por reducción y alquilación. Las muestras ricas en formas G_2^A se incubaron con b-mercaptoetanol y después se expusieron al agente alquilante iodoacetato. Los extractos control (C), y los sometidos a reducción y alquilación (R-A) se centrifugaron en gradientes con Triton X-100. Los marcadores de sedimentación fueron catalasa (11.4S) y fosfatasa alcalina (6.1S).

electricus; estos últimos se pueden convertir en monómeros por la degradación proteolítica seguida de un tratamiento reductor, o por calentamiento o congelación. Por otro lado, las especies dimericas de AChE del núcleo caudal de cerebro bovino no alteran su actividad cuando se separan los monómeros por alquilación-reducción (Massoulié y Bon, 1982).

Se ha observado que, la forma G_2^A de AChE de *Torpedo* pierde su actividad con reactivos de tioles. Esto se debe a la formación de un complejo entre la AChE y el agente que reac-

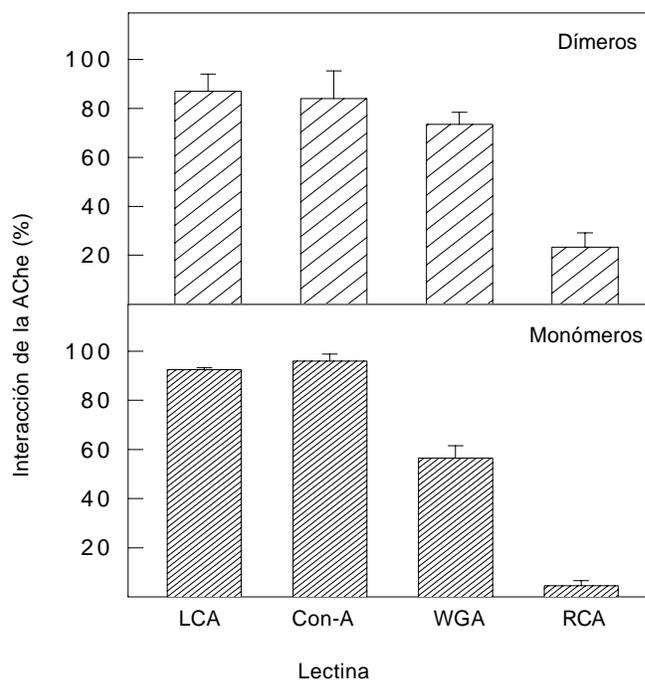


FIGURA 3. Interacción de las formas moleculares de AChE en eritrocito de ratón con lectinas. Alícuotas del extracto (0.5-1.0 ml) se mezclaron con 0.25-0.5 ml de Sepharose-4B (control sin aglutinina) o de Con A-, LCA-, WGA- o RCA, ligadas todas a agarosa. Una vez separados los complejos enzima-lectina por centrifugación, se determinó la actividad AChE en los sobrenadantes. Para descontar la interacción no específica de la enzima con el gel, se calcularon los porcentajes de fijación de la enzima a las lectinas, por referencia a la actividad en el sobrenadante control (muestra incubada con el gel sin lectina, Sepharose-4B). Los resultados muestran el promedio y desviación estándar de cinco experimentos.

ción con el grupo tiol libre del resto C^{231} . El mismo efecto se observa si la enzima se incubaba con el agente alquilante de tioles N-etilmaleimida (NEM) (Dolginova y col., 1992).

Las subunidades de los dímeros también se pueden disociar con guanidina 1.5 M, incluso en ausencia de químicos reductores. El agente desnaturante facilita el intercambio de los enlaces disulfuro inter e intracatenarios con el grupo tiol libre, lo que modifica el patrón de enlaces disulfuro de la proteína, altera la estructura terciaria y debilita las interacciones intersubunitarias, lo que finalmente lleva a la formación de monómeros inactivos.

b) Interacción de los dímeros y monómeros de AChE con lectinas

La secuencia del ADNc de la AChE de ratón muestra tres sitios potenciales de N-glicosilación (Rachinsky y col., 1990). Los oligosacáridos de las moléculas de AChE se procesan paso por paso, reflejando el tránsito de la enzima a través de los distintos compartimientos celulares.

La glicosilación de la AChE y de otras proteínas permite que el polipéptido adquiera la estructura cuaternaria o terciaria idónea para su localización celular (Rotundo y col., 1989;

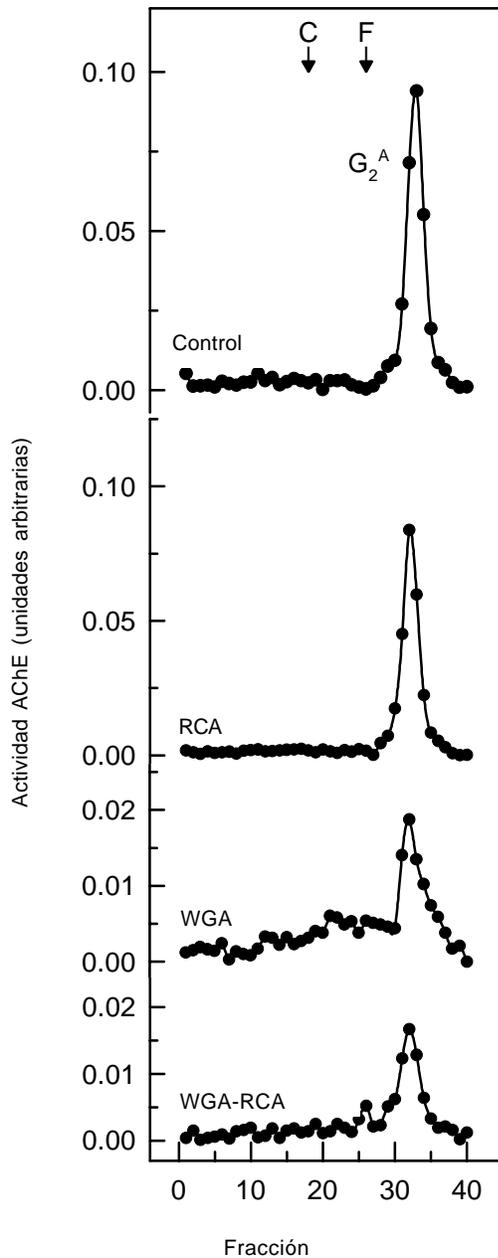


FIGURA 4. Carácter glicosídico de los dímeros de AChE en eritrocito de ratón. Se incubó un ml de extracto con 0.5 ml de Sepharose-4B (control) o con las lectinas inmobilizadas RCA- y WGA-agarosa en agitación 16 h a 4°C. La fracción no ligada a RCA, se reincubó con WGA-agarosa. Las moléculas no ligadas a las lectinas se identificaron por centrifugación en gradientes de sacarosa con Brij-96. La actividad AChE se midió por el método de microplaca.

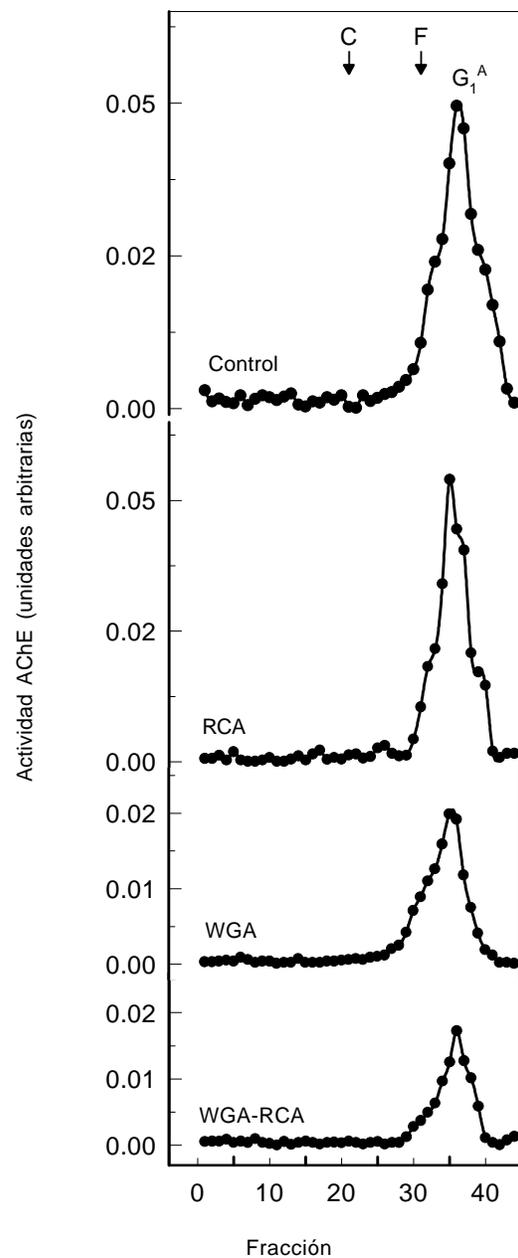


FIGURA 5. Los monómeros de AChE en eritrocito de ratón varían en la composición de azúcares. La preparación rica en monómeros (1 ml), se incubó con 0.5 ml de Sepharose-4B (control) o con las lectinas RCA-, WGA-agarosa, a 4°C en agitación por 16 h. La fracción no reconocida por RCA, se volvió a incubar con WGA-agarosa (WGA/RCA). En cada fracción de gradiente se midió la actividad AChE por el método de microensayo.

Moral-Naranjo y col., 1999). La presencia de N-glicanos en la estructura de las proteínas puede jugar un papel importante en la prevención de la proteólisis del dominio extracelular, porque se ha demostrado que la glicosilación aumenta la estabilidad dinámica de una proteína, mientras la variabilidad en las glicofomas aumenta su resistencia a la digestión por proteasas (Rudd y col., 1994).

El uso de las lectinas inmobilizadas permitió conocer la naturaleza de los azúcares terminales de los oligosacáridos unidos covalentemente a la AChE, al analizar la adsorción de esta enzima a las lectinas de concanalina-A, lenteja, germen de trigo y ricino.

La interacción con lectinas reveló que la mayoría de los dímeros de eritrocito de ratón se unieron a Con A (90-95%),

LCA (90-95%) y WGA (70-75%), lo que indicó que una fracción importante de los oligosacáridos ligados a la AChE contienen en sus extremos manosa, fucosa y NacGlc (o ácido siálico) que son los azúcares necesarios para la unión eficaz de las glicoproteínas a las lectinas Con A, LCA y WGA, respectivamente. Parte de la AChE (25-30%) se fijó a la lectina RCA (Figura 3), demostrando que una pequeña fracción de la AChE presenta galactosa terminal o ácido siálico.

El porcentaje de dímeros de AChE con galactosa terminal es menor en los eritrocitos de ratón que en los de humanos, ya que en éstos alrededor del 80% de la AChE se fija a RCA (Vidal, 1996). Aquella fracción de los dímeros que no fue reconocida por RCA, tampoco lo fue por WGA, hecho que quedó evidenciado en la interacción secuencial con ambas lectinas (Figura 4).

La elevada interacción de la AChE con las lectinas LCA y WGA demuestra que la enzima de eritrocito de ratón contiene oligosacáridos complejos, que se incorporan a la proteína a través de la ruta celular que conduce del lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER) a la región más distal (trans) del Complejo de Golgi.

Como en el plasma de ratón hay monómeros, dímeros y tetrámeros de AChE, se podría suponer que parte de los dímeros del plasma procedieran de los eritrocitos. En principio, como tales dímeros nativos, las moléculas de AChE del eritrocito no pueden pasar al plasma porque son anfifílicas y los del plasma completamente hidrofílicos (García-Ayllón y col., 1999).

Sin embargo, cabe la posibilidad de que una fracción escasa de los dímeros ligados a la membrana de los eritrocitos pasen al plasma por la acción de la fosfolipasa C o por proteasas plasmáticas. Los dímeros así obtenidos se comportarían como moléculas hidrofílicas, lo mismo que los del plasma. Esta alternativa no se puede desechar, ya que los patrones de interacción de los dímeros de AChE de eritrocito o plasma de

ratón (Cabezas-Herrera y col., 1994) con las lectinas WGA o RCA son muy parecidos.

Cabe señalar que en el músculo esquelético de ratón se han encontrado diferencias en la glicosilación entre los monómeros y oligómeros de AChE (Vidal, 1996).

Con las fracciones enriquecidas en monómeros activos de AChE, se averiguó si las dos subunidades que componen los dímeros poseían o no los mismos restos de oligosacáridos. Los resultados revelaron que, como era previsible, todos los monómeros se unían a Con-A (90-95%) y a LCA (85-90%). Sin embargo, la unión disminuyó con WGA (55-60%) y RCA (5-10%) (Figura 3).

Parece que la composición de algunos oligosacáridos unidos a las isoformas de AChE en el mismo tejido de especies animales distintas es muy parecida, lo que lleva a admitir que la estructura de estos oligoglicanos se ha conservado a lo largo de la evolución (Liao y col., 1991).

Cuando se analizó la interacción secuencial con las lectinas RCA y WGA, se observó que algunos monómeros no fueron reconocidos ni por WGA, ni por RCA (Figura 5).

Estos resultados prueban que, aunque la asociación de las subunidades de AChE para formar los dímeros ocurre en el RER de las células precursoras de los eritrocitos (eritroblastos), los oligosacáridos unidos a cada subunidad enzimática se procesan en el Golgi siguiendo un patrón no uniforme. Por esta razón, no todos los dímeros tienen la misma composición de azúcares: la mayoría incorpora NacGlc o ácido siálico, otros carecen de esos azúcares, algunos poseen galactosa y otros están desprovistos de NacGlc, ácido siálico y galactosa. En consecuencia, a partir de la misma subunidad enzimática se generan distintas glicofomas (Figura 5).

Aunque todos los dímeros de AChE sigan la misma ruta hasta su destino final, tal vez las diferencias en los azúcares de las subunidades dependan de la accesibilidad de las glicosiltransferasas del Golgi.

REFERENCIAS

- Arpagaus, M., Combes, D., Culetto, E., Grauso, M., Fedon., Romani, R. y Toutant, J.-P. (1998). "Four acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*". *J. Physiol. (Paris)* 92, 363-367.
- Bartha, E., Olah, E., Szelényi, J.G. y Hollan, S.R. (1987). "Characterization of 'fetal-type' acetylcholinesterase in hemintreated K-562 cell culture". *Blood Cells* 12, 647-651.
- Bon, S., Meflah, K., Musset, F., Grassi, J. y Massoulié, J. (1987). "An immunoglobulin M monoclonal antibody, recognizing a subset of acetylcholinesterase molecules from electric organs of *Electrophorus* and *Torpedo*, belongs to the HNK-1 anti-carbohydrate family". *J. Neurochem.* 49, 1720-1731.
- Bon, S., Toutant, J.P., Meflah, K. y Massoulié, J. (1988). "Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: II. Electrophoretic variants and phosphatidylinositol phospholipase C-sensitive and -insensitive forms". *J. Neurochem.* 51, 786-794.
- Burstein, S. A., Adamson, J. W. y Harker, L. A. (1980). "Megakaryocytopoiesis in culture: modulation by cholinergic mechanisms". *J. Cell. Physiol.* 54, 201-208.
- Cabezas-Herrera, J., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (1994). "Amphiphilic properties of molecular forms of acetylcholinesterase in normal and dystrophic muscle". *J. Neurosci. Res.* 38, 505-514.
- Chance, B. y Herbert, D. (1950). "Catalases and peroxidases. XIV. Enzyme-substrate compounds of bacterial catalase and peroxidases". *Biochem. J.* 46, 402-414.
- Chatonnet, A. y Lockridge, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 260, 625-634.
- Doctor, B. P., Chapman, T. C., Christner, C. E., Deal, C. D., De la Hoz, D. M. y Gentry, M. K. (1990). "Complete amino acid sequence of fetal bovine serum acetylcholinesterase and its comparison in various regions with other cholinesterases". *FEBS Lett.* 266, 123-127.
- Dolginova, E.A., Roth, E., Silman, I. y Weiner, L.M. (1992). "Chemical modification of *Torpedo* acetylcholinesterase by disulfides: appearance of a 'molten globule' state". *Biochemistry.* 31, 12248-12254.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. J. y Featherstone, R. M. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Futerman, A. H., Low, M. G. y Silman, I. (1983). "A hydrophobic dimer of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* electric organ is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C". *Neurosci. Lett.* 40, 85-89.
- García, L., Verdière-Sahuqué, M., Dreyfus, P. A., Nicolet, M. y Rieger, F. (1988). "Association of tailed acetylcholinesterase to lipidic membranes in mammalian skeletal muscle". *Neurochem. Int.* 13, 231-236. García y col., 1988b
- García-Ayllón, M. S., Gómez, J. L. y Vidal, J. C. (1999). "Amphiphilic properties of acetylcholinesterase monomers in mouse plasma". *Neurosci. Lett* 265, 211-214.
- Garen, A. y Levinthal, C. (1960). "Fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *Escherichia coli*". I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 38, 470-483.
- Gómez, J. L., Moral-Naranjo, M. T., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (1999). Characterization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase forms in normal and dystrophic Lama2dy mouse heart". *J. Neurosci. Res.* 56, 295-306.
- Gómez, J. L., García-Ayllón, M. S., Campoy, F. J. y Vidal, C. J. (2000). "Muscular dystrophy alters the processing of light acetylcholinesterase but not butyrylcholinesterase forms in liver of Lama2dy mice". *J. Neurosci. Res.* 62, 134-145.
- González, R., Campos, E. O., Morán, S. e Inestrosa, N. C. (1991). "Characterization of acetylcholinesterase from human heart auricles: Evidence for the presence of a G-form sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C". *Gen. Pharmac.* 22, 107-110.
- Grassi, J., Vigny, M. y Massoulié, J. (1982). "Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: solubility properties and hydrophobic character". *J. Neurochem.* 38, 457-469.
- Haas, R., Marshall, T. L. y Rosenberry, T. L. (1988). "*Drosophila* acetylcholinesterase: demonstration of a glycosinoyl phospholipid anchor and an endogenous proteolytic cleavage". *Biochemistry* 27, 6453-6457
- Liao, J., Heider, H., Sun, M.C., Stieger, S. y Brodbeck, U. (1991). "The monoclonal antibody 2G8 is carbohydrate-specific and distinguishes between different forms of vertebrate cholinesterases". *Eur. J. Biochem* 198, 59-65.
- Low, M.G. (1989). "Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins". *FASEB J.* 3, 1600-1608.
- Marcos, M. R., Sánchez-Yagüe, J., Hernández-Hernández, A. y Llanillo, M. (1998). "Amphiphilic and hydrophilic forms of acetylcholinesterase from sheep platelets". *Biochim. Biophys. Acta* 1415, 163-173.
- Marnay, A. y Nachmansohn, D. (1938). "Cholinesterase in voluntary muscle". *J. Physiol.* 92, 37-47.
- Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961). "A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes. Applications

- to protein mixtures". *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.
- Masson, P., Froment, M. T., Fortier, P. L., Visicchio, J. E., Bartels, C. F. y Lockridge, O. (1998). "Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters". *Biochim. Biophys Acta* 1387, 41-52.
- Massoulié, J. y Bon, S. (1982). "The molecular forms of cholinesterases and acetylcholinesterase in vertebrates". *Annu. Rev. Neurosci.* 5, 57-106.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. y Vallette, F. M. (1993). "Molecular and cellular biology of cholinesterases". *Prog. Neurobiol.* 41, 31-91
- McIntosh, D. B. y Davidson, G. A. (1984). "Effects of non-solubilizing concentrations of Triton X-100 on Ca^{2+} ATPase of sacroplasmic reticulum". *Biochemistry* 23, 1959-1965.
- Meflah, K., Bernard, S. y Massoulié, J. (1984). "Interactions with lectins indicate differences in the carbohydrate composition of the membrane-bound enzymes acetylcholinesterase and 5'-nucleotidase in different cell types". *Biochimie* 66, 59-69.
- Moore, B. R., Manery, J. F., Still, J. y Mankad, V. N. (1989). "The inhibitory effects of polyoxyethylene detergents on human erythrocyte acetylcholinesterase and $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase". *Cell. Biol.* 67, 137-146.
- Moral-Naranjo, M.T., Campoy, F. J., Cabezas-Herrera, J. y Vidal, C. J. (1999). "Increase butyrylcholinesterase levels in microsomal membranes of dystrophic *Lama2^{dy}* mouse muscle". *J. Neurochem.* 73, 1138-1144.
- Ott, P., Lustig, A., Brodbeck, U., Rosenbusch, J. P. (1982). "Acetylcholinesterase from human erythrocyte membranes: Dimers as functional units". *FEBS Lett.* 138, 187-189.
- Prody, C.A., Gnat, A., Zevin-Sonkin, D., Gnat, A., Goldberg, O. y Soreq, H. (1987). "Isolation characterization of full-length cDNA clones for cholinesterase from fetal human tissues". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 3555-3559.
- Rachinsky, T. L., Camp, S. Li, Y., Newton, M. y Taylor, P. (1990). "Molecular cloning of mouse acetylcholinesterase: tissue distribution of alternatively spliced mRNA species". *Neuron* 5, 317:327.
- Richier, P., Arpagaus, M. y Toutant, J. P. (1992). "Glycolipid-anchored acetylcholinesterase from rabbit lymphocytes and erythrocytes differ in their sensitivity to phosphatidylinositol-specific phospholipase C". *Biochim. Biophys. Acta* 1112, 83-88
- Roberts, W. L. y Rosenberry, T. L. (1985). "Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 133, 621:627.
- Rotundo, R. L., Thomas, K., Porter-Jordan, K., Benson, R. J. J., Fernández-Valle, C. y Fine, R. E. (1989). "Intracellular transport, sorting and turnover of acetylcholinesterase". *J. Biol. Chem.* 264, 3146-3152.
- Rudd, P. M., Joao, H. C., Coghill, E., Fiten, P., Saunders, M. R., Opendakker, G. y Dwek, R. A. (1994). "Glycoforms modify the dynamics stability and functional stability of an enzyme". *Clin Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 1-100.
- Sáez-Valero, J. y Vidal, C. J. (1995). "Monomers and dimers of acetylcholinesterase in human meningioma are anchored to the membrane by glycosylphosphatidylinositol". *Neurosci. Lett.* 195, 101-104.
- Skau, K.A. (1985). "Acetylcholinesterase molecular forms in serum and erythrocyte of laboratory animals". *Comp. Biochem. Physiol.* 80C, 207-210.
- Soreq, H., Patinkin, D., Lev-Lehman, E., Grifman, M., Ginzberg, D., Eckstein, F. y Zakut, H. (1994). "Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7907-7911.
- Velan, B., Kronman, C., Ordentlich, A., Flashner, Y., Leitner, M., Cohen, S. y Shafferman, A. (1993). "N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis". *Biochem. J.* 296, 649-656.
- Vidal, C.J. (1996). "Glycosylation of cholinesterases and its alteration in some pathological processes". *Recent. Res. Dev. Neurochem.* 1, 37-54.

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS MECANISMOS REGULADORES DEL PH intracelular (pHi) de linfocitos humanos, por diversas quinasas*

Laura A. de la Rosa,** Mercedes R. Vietes*** y Luis M. Botana***

Las células eucariotas regulan su pHi mediante el funcionamiento de proteínas de membrana que actúan como transportadores iónicos, y cuya actividad puede estar a su vez sujeta a la regulación por diversas señales de transducción, incluyendo procesos de fosforilación por quinasas. En el presente trabajo hemos estudiado el efecto de fármacos que modifican la actividad de 4 quinasas citosólicas de linfocitos humanos, sobre la actividad de los transportadores iónicos implicados en la recuperación del pHi tras una acidificación intracelular.

INTRODUCCIÓN

El pH intracelular, o citosólico (pHi)¹ es determinante para un sinnúmero de funciones celulares, ya que influye en la actividad de numerosas enzimas y canales iónicos así como en los procesos de síntesis de ADN y ARN (Madshus, 1988). El pHi es regulado activamente por todas las células eucariotas, las cuales mantienen una concentración intracelular de iones H⁺ menor a la esperada según el equilibrio electroquímico de dicho ion a ambos lados de la membrana plasmática; además las células deben contrarrestar el efecto acidificante derivado de las reacciones del metabolismo. Esta regulación se consigue básicamente mediante el funcionamiento de diversos transportadores iónicos, que son proteínas de membrana que movilizan iones H⁺ o HCO₃⁻ en contra de su gradiente electroquímico, alcalinizando el citosol. Sin embargo, existen también transportadores iónicos cuya función es acidificar el citosol celular.

El intercambiador Na⁺/H⁺ es una proteína transmembrana que transporta iones H⁺ y Na⁺ en sentidos opuestos, es decir, es un antiporte cuya función celular principal es la regulación del pHi. El intercambiador Na⁺/H⁺ es el mecanismo de regulación del pHi más estudiado, y se sabe que la proteína intercambiadora se expresa en la gran mayoría de las células eu-

cariotas (Noël, 1995). El intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE, de Na⁺/H⁺ Exchanger) utiliza el gradiente electroquímico del ion Na⁺, generado por la bomba ATPasa de Na⁺/K⁺, para extraer H⁺ del citosol celular, por lo que alcaliniza este último. El NHE es electroneutro, es decir, no modifica el potencial eléctrico de la membrana plasmática, ya que intercambia 1 Na⁺ extracelular por un H⁺ intracelular (Tse, 1993).

En células de mamíferos, existen al menos 5 isoformas de NHE. El NHE1 se expresa en la mayoría de las células y es el principal responsable de la regulación del pH y volumen intracelulares (Noël, 1995). Esta isoforma es la más sensible al diurético amilorida, utilizado para inhibir de manera específica a los NHEs. La actividad de todos los intercambiadores Na⁺/H⁺ es dependiente de la concentración intracelular de H⁺ (se activan cuando desciende el pHi) y se modifica en respuesta a diversos estímulos extracelulares, muchos de los cuales actúan a través de rutas intracelulares de transducción que inciden en al menos una quinasa.

En linfocitos humanos se ha detectado la existencia del NHE1 (Siczkowski, 1994), que se activa en respuesta a mitógenos y activadores de la PKC, sin embargo, esta activación no parece ser necesaria para la continuidad de la respuesta celular (Grinstein, 1989).

Otro grupo de importantes mecanismos reguladores del pHi

* El presente trabajo es parte de la tesis doctoral de Laura A. de la Rosa.

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

*** Departamento de Farmacología, Universidad de Santiago de Compostela.

1 **ABREVIATURAS:** pHi: pH intracelular; NHE intercambiador sodio-protones; PKC: proteína-quinasa C; DIDS: 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-ácidosulfónico; SITS: 4-acetamida-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-ácido disulfónico; PKA: proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico; PTKs: proteína-tirosina-quinasa; PI3-K: fosfatidil inositol 3-quinasa; BCECF-AM: [2',7'-bis(carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína éster acetoximetilo]; TPA (forbol 12-miristato 13-acetato); ChC: cloruro de cheleritrina; H89 N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinosulfonamida.2HCl; HEPES: N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico].

está representado por la familia de transportadores de HCO_3^- , que incluye a los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependientes e independientes de Na^+ y a los cotransportadores $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$. A pesar de que el transporte de HCO_3^- es, como el intercambio Na^+/H^+ , un fenómeno común a la mayoría de las células eucariotas; la naturaleza de los transportadores de membrana que llevan a cabo este proceso varía en los diferentes tipos celulares.

Existen dos tipos de intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ independiente de Na^+ , o intercambiador aniónico (AE, de Anion Exchanger), identificado y clonado por primera vez en eritrocitos de cordero, donde juega un papel importante en el transporte de CO_2 ; y el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ , cuya identidad molecular ha sido recientemente caracterizada (Romero, 2000). Ambos tipos de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ han sido descritos en gran número de células animales, en las que participan en los mecanismos de mantenimiento del pH, volumen y concentración de Cl^- intracelulares (Alper, 1994). Los intercambiadores aniónicos utilizan el gradiente de Cl^- hacia el interior celular para extraer HCO_3^- ; por lo tanto, son los principales encargados de acidificar el citosol. En cambio el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ utiliza el gradiente de este último ion para introducir HCO_3^- y extraer Cl^- , por lo que, al igual que los NHEs, alcaliniza el citosol celular. Ambos tipos de intercambiadores son electroneutros e inhibidos por los estilbenos DIDS y SITS (Alper, 1994).

A diferencia de los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ los cotransportadores $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ son electrogénicos e independientes de Cl^- ; sin embargo, al igual que los anteriores, son inhibibles por DIDS y SITS (Romero, 1999). Existen diversos cotransportadores $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$, que funcionan como alcalinizadores o acidificadores del citosol, dependiendo de su estequiometría.

La actividad de los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y de los cotransportadores $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ también puede ser modulada por diversas señales extracelulares, sin embargo, los mecanismos de transducción que pueden estar implicados en esta modulación han sido poco estudiados.

En linfocitos de rata se ha descrito un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ que participa en los procesos de regulación del volumen celular (Grinstein, 1990). Sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo, los estudios realizados sobre regulación del pH en linfocitos humanos sólo habían tenido en cuenta al intercambiador Na^+/H^+ , por lo que se llevaban a cabo en medios que no contenían el ion HCO_3^- . Más recientemente, se ha observado que los transportadores de HCO_3^- de células linfoides pueden estar implicados en algunas alteraciones patológicas y procesos celulares fisiológicos, como la apoptosis (Redon, 1994; Tepel, 1998; Tsao, 1996).

Nuestros estudios previos han sugerido la existencia de un transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+ y un intercambiador aniónico ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), que junto al intercambiador Na^+/H^+ son los responsables de la regulación del pH en linfocitos humanos de sangre periférica, y cuya actividad puede estar sujeta a modulación por procesos de fosforilación (De la

Rosa, 1999). Por lo tanto, hemos decidido estudiar la importancia de las siguientes quinasas: PKC, PKA, PTKs y PI3-K; sobre la actividad de los mecanismos reguladores del pH, dependientes e independientes de HCO_3^- , de este modelo celular, mediante el uso de la sonda fluorescente BCECF, sensible a la concentración de iones H^+ .

MATERIAL Y MÉTODOS

A) Reactivos y medios

Para la purificación de linfocitos se utilizó Ficoll-Hypaque® de Pharmacia (España). Para la determinación del pH se utilizó el indicador fluorescente BCECF-AM, comprado a Molecular Probes (Holanda).

Amilorida, DIDS, nigericina, TPA y wortmanina se compraron a Sigma (USA). ChC, genisteína, forskolina y H89, fueron de Alexis (Suiza). Las demás sales y reactivos utilizados para la preparación de los medios se compraron a diversas casas comerciales, siendo todos ellos de la mayor pureza existente.

Para la purificación de linfocitos se utilizó el siguiente medio: NaCl 125 mM, KCl 0.5 mM, MgCl_2 0.1 mM, glucosa 0.5 mM y TRIZMA base 14.5 mM y heparina 4 unidades/ml. El pH se ajustó a 7.6 con HCl 1N.

Para los experimentos de regulación del pH se utilizaron medios con una composición iónica modificada a partir de un medio base:

Medio base tamponado con HEPES (sin HCO_3^-): NaCl 140 mM, KCl 14 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, HEPES 10 mM y glucosa 10 mM. *Medio sin Na^+ :* el NaCl se reemplazó por cloruro de colina. *Medio con HCO_3^- :* NaCl 118 mM, NaHCO_3 22 mM, los demás componentes mantuvieron su concentración. *Medio sin Na^+ , con HCO_3^- :* el NaCl se sustituyó con cloruro de colina y el NaHCO_3 por KHCO_3 . *Medio sin Cl^- (Gluconato):* todos los cloruros se reemplazaron por sales del ácido glucónico, excepto el MgCl_2 , que fue reemplazado por MgSO_4 . *Medio sin Cl^- y sin Na^+ (Manitol):* el NaCl fue sustituido por manitol (el doble de concentrado), el resto de los iones se conservaron igual que en el medio con gluconato. Estos dos últimos medios pueden contener o no HCO_3^- . *Medio rico en K^+ (utilizado para la calibración):* KCl 141 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, HEPES 20 mM y glucosa 10 mM.

B) Obtención y purificación de linfocitos humanos

Los linfocitos fueron obtenidos de sangre de donantes sanos, a partir de bolsas de concentrado de células sanguíneas (buffy coats), proporcionada por el Banco de Sangre de Galicia, a través del Servicio de Hematología del Hospital General de Lugo.

La purificación se llevó a cabo mediante la técnica de centrifugación a través de un gradiente de densidades utilizando para ello Ficoll-Hypaque®, de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Diluir el concentrado celular en medio de purificación 1 (dilución 1:2).

2. Desfibrinar mediante agitación con bolas de vidrio (1 bola por ml de dilución, 30 minutos).

3. Eliminar el exceso de plaquetas del concentrado celular, mediante 3 lavados sucesivos, rediluyendo con medio de purificación (llevar 16 ml de sangre diluida hasta 25) y centrifugando a baja velocidad (300 g, 20 minutos).

4. Colocar cuidadosamente 4 ml de sangre (dilución original 1:2) sobre 2.5 ó 3 ml de Ficoll comercial.

5. Centrifugar a temperatura ambiente, 40 minutos a 1000 g.

6. Retirar y desechar el sobrenadante, que contiene plasma y plaquetas. Conservar la capa de células que se ha depositado sobre el reactivo de separación, ya que ésta contiene los linfocitos purificados. Desechar el pellet, que contiene eritrocitos y granulocitos que lograron atravesar la capa de Ficoll.

7. Lavar los linfocitos 2 veces, con medio de purificación con heparina, centrifugando a 700 g durante 8 minutos.

Las células purificadas se contaron mediante un contador de células sanguíneas modelo System 9000 Coulter Counter (Menarini Diagnóstico Spain). Mediante ambos protocolos, la pureza media de los linfocitos fue siempre superior al 70%.

C) Determinación de la concentración intracelular de iones H^+ (pHi), mediante el uso de indicadores fluorescentes

El pH citosólico se determinó mediante el uso del indicador fluorescente BCECF-AM, el cual es permeable a la membrana celular. Una vez dentro de la célula, el BCECF-AM es hidrolizado por las esterasas citosólicas, generando BCECF libre, cuya fluorescencia es sensible a la concentración de H^+ a una longitud de onda de excitación de 490 nm, y de emisión de 530 nm (la intensidad aumenta al aumentar el pH, es decir, al disminuir la concentración de H^+). Para determinar el pHi sin interferencia del número de células, pérdida o diferencia de carga del indicador, es importante el uso de un cociente de intensidades de fluorescencia, en lugar de una única intensidad. Por lo tanto, también se midió la fluorescencia del BCECF a una longitud de onda de excitación de 440 nm y de emisión a 530 nm, la cual es insensible a la variación del pH (punto isobéptico). El pHi se calculó a partir del cociente de intensidades de emisión a 530 nm, a las longitudes de onda de excitación: 490/440, mediante una recta de calibrado generada cada día de experimento.

Para cargar el indicador, entre 1 y 2 millones de células fueron incubadas en 1 ml durante 20 minutos, a 37°C con 1 μ M de BCECF-AM. A continuación fueron lavadas dos veces con medio frío y centrifugadas a 1000 g durante 3 minutos a 5°C. La calibración se realizó mediante la exposición de las células cargadas, en un medio rico en K^+ , con nigericina 50 mM y ajustado a diferentes valores de pH extracelular (pHo) (Thomas, 1979).

D) Medidas de fluorescencia

La fluorescencia de las células cargadas con BCECF se midió en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5000 que utiliza como fuente de luz una lámpara de xenón de 150 W y monocromadores

para fijar las longitudes de onda de excitación y emisión. Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura de 37°C mediante un sistema de circulación de agua.

Las células cargadas se colocaron en suspensión, en un volumen final de 1 ml, en una microcubeta de cuarzo de 1,5 ml de capacidad y la medición de la fluorescencia del BCECF se realizó a longitudes de onda de 490 y 440 nm de excitación y 530 nm de emisión con ancho de banda de 5 nm, en un modo de doble excitación. La adición de los fármacos se realizó con pipeta, a través de un orificio colocado directamente sobre la cubeta. Para los experimentos realizados en un medio con HCO_3^- , se inyectó CO_2 al 5% al interior de la cámara de medición.

E) Acidificación citosólica por preincubación con NH_4^+

Para activar de manera más eficiente a los transportadores iónicos reguladores del pHi, se llevó a cabo una acidificación intracelular mediante la técnica de preincubación con una sal amónica. Para ello, se preincubaron las células con NH_4Cl 50 mM, al mismo tiempo que se llevaba a cabo la carga del indicador, de modo que al comenzar el registro de fluorescencia, el NH_4^+ había sido retirado del medio extracelular, por lo que las células presentaron un pHi inferior al basal (De la Rosa, 1999).

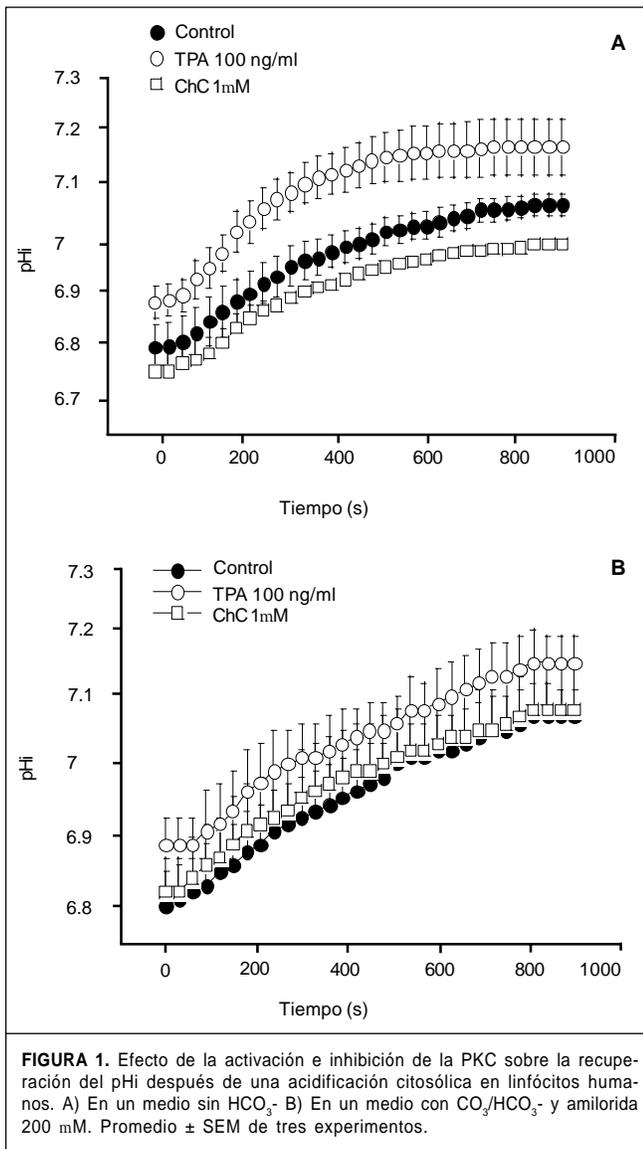
Esta técnica consiste en que el NH_4Cl en disolución da lugar a NH_3 , que es altamente permeable a la membrana celular, por lo que la atraviesa, hasta alcanzar el equilibrio; y actúa como una base débil, alcalinizando el citosol al combinarse con los iones H^+ libres, mientras que el NH_4^+ , penetra más lentamente, produciendo una ligera recuperación del pHi. Por otro lado, cuando el NH_4Cl es retirado del medio extracelular, el NH_3 intracelular saldrá rápidamente de la célula, liberando protones que sumados a los que produjo la entrada de NH_4^+ y a la recuperación activa del pHi, producirá una acidificación citoplasmática.

F) Análisis estadístico

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

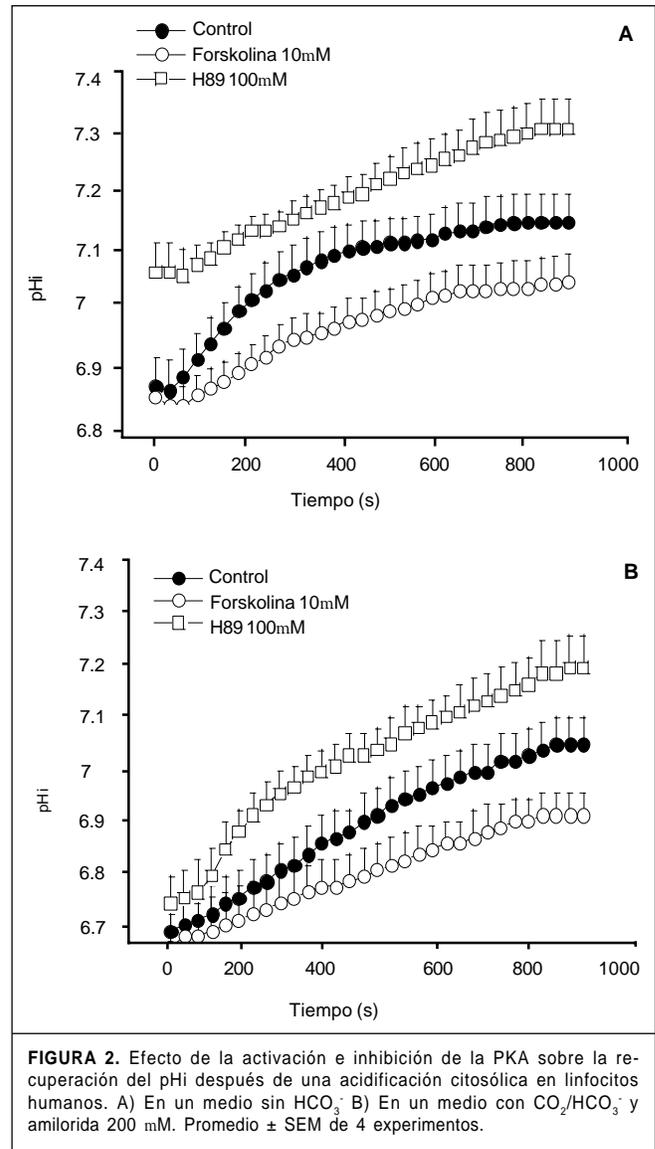
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, los linfocitos poseen dos transportadores implicados en la recuperación del pHi después de una acidificación: un intercambiador Na^+/H^+ que, en un medio sin HCO_3^- es el único mecanismo alcalinizador, y un transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+ que podría ser un cotransportador electrogénico $Na^+-HCO_3^-$, pero que, por no poder comprobar su identidad denominaremos simplemente transportador de HCO_3^- (De la Rosa, 1999). En presencia de HCO_3^- extracelular, ambos mecanismos contribuyen de manera equivalente a la recuperación del pHi después de una acidi-



ficación citosólica; sin embargo, la utilización del inhibidor amilorida, específico para el intercambiador Na^+/H^+ , permite registrar la alcalinización intracelular dada, exclusivamente, por la actividad del transportador de HCO_3^- .

Considerando lo anterior, en la figura 1 se muestra el efecto de la estimulación e inhibición de la PKC sobre la recuperación del pHi de células acidificadas mediante la técnica de preincubación con NH_4^+ . En la Figura 1A, se observa la recuperación dependiente de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (en un medio sin HCO_3^-) y en la Figura 1B, la dependiente del transportador de HCO_3^- (en un medio con HCO_3^- y amilorida). La estimulación de la PKC se consiguió mediante la adición del éster de forbol TPA (100 ng/ml) a la cubeta de medición justo antes de comenzar el experimento. Por su parte, el cloruro de cheleritrina (ChC 1 mM) se utilizó para inhibir a la quinasa para lo cual fue necesario una preincubación de 10 minutos, al mismo tiempo que se realizaba la carga del indicador fluorescente.



En esta figura se puede observar que la actividad de la PKC es importante para determinar la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , pero no del transportador de HCO_3^- (gráficas A y B, respectivamente). La estimulación de la PKC estimula a su vez la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , mientras que su inhibición reduce ligeramente la actividad del mismo, indicando que, cierto nivel basal de actividad de la PKC podría ser necesario para garantizar una estimulación máxima del intercambiador Na^+/H^+ en respuesta a una acidificación intracelular. Esta observación tiene sentido, ya que la proteína responsable del intercambio Na^+/H^+ está fosforilada en su estado basal, en sitios susceptibles de ser diana de la PKC.

En la Figura 2, se muestra el mismo tipo de experimento, para analizar el efecto de la PKA. Los fármacos forskolina y H-89 se utilizaron para estimular e inhibir, respectivamente, a la quinasa (10 minutos de preincubación a 37° C). En esta figura se observa que, a diferencia de la PKC, la PKA modula la

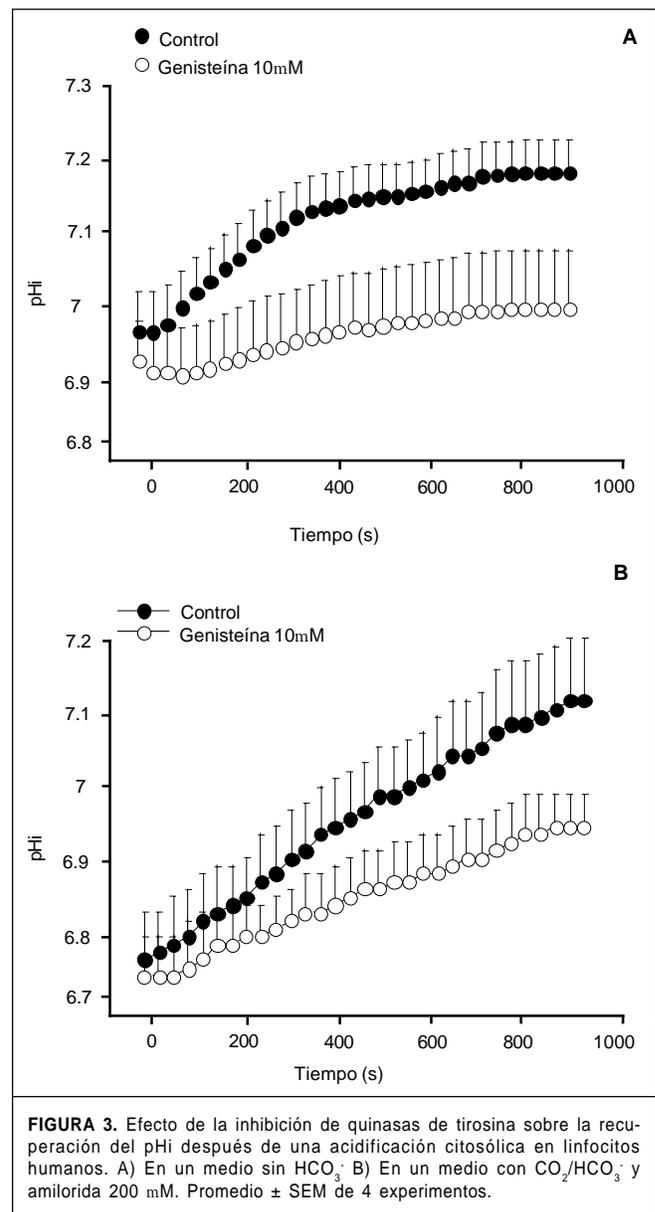
actividad de ambos transportadores. Otra diferencia importante entre ambas quinasas es que, mientras que la estimulación de la PKC tiene un efecto positivo sobre la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , la estimulación de la PKA inhibe la actividad de ambos transportadores involucrados en la alcalinización citosólica. Asimismo, la inhibición de la actividad basal de la PKA con H-89 estimula la recuperación del pHi, después de una acidificación, dada por el intercambiador Na^+/H^+ y por el transportador de HCO_3^- .

La regulación de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ por PKC y PKA es un tema que ha sido bastante estudiado. Se sabe que la PKC estimula la actividad del intercambiador en numerosos modelos celulares (Alfonso, 1994; Ozaki, 1990), mediante un incremento de la afinidad del mismo, por los H^+ intracelulares (Grinstein, 1985b, Paris, 1984), que produce una activación del intercambiador a valores de pHi a los que normalmente estaría en reposo. Por tanto, la estimulación de la PKC puede activar al intercambiador Na^+/H^+ a un valor de pHi basal. El mecanismo por el cual la PKC modifica la afinidad del intercambiador Na^+/H^+ por los iones H^+ puede ser a través de fosforilación directa de la proteína intercambiadora (Grinstein, 1986). Otros autores observaron que no todas las isoformas del intercambiador Na^+/H^+ pueden ser activadas por PKC, solamente los NHE 1 y 2 tienen esta propiedad, mientras que el NHE3 es inhibido por la PKC (Kandasamy, 1995).

De manera similar, los mismos autores encontraron que la estimulación de la PKA tiene un efecto positivo sobre la actividad de las isoformas NHE1 y NHE2 y un efecto negativo sobre la actividad del NHE3 (Kandasamy, 1995). Por su parte, Azarani y sus colaboradores observaron que el NHE1 nativo de osteoblastos de la línea celular UMR-106 se activa en respuesta a estímulos externos, a través de la ruta del AMPc/PKA. Sin embargo, otros estudios han observado un efecto inhibitorio o una falta de efecto de la PKA sobre la actividad del NHE1 (Levine, 1993; Schulte, 1999). Además, la isoforma NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ no posee sitios que puedan ser fosforilados por PKA (Noël, 1995), por lo que el mecanismo mediante el cual esta quinasa interactúa con el transportador tiene que ser indirecto.

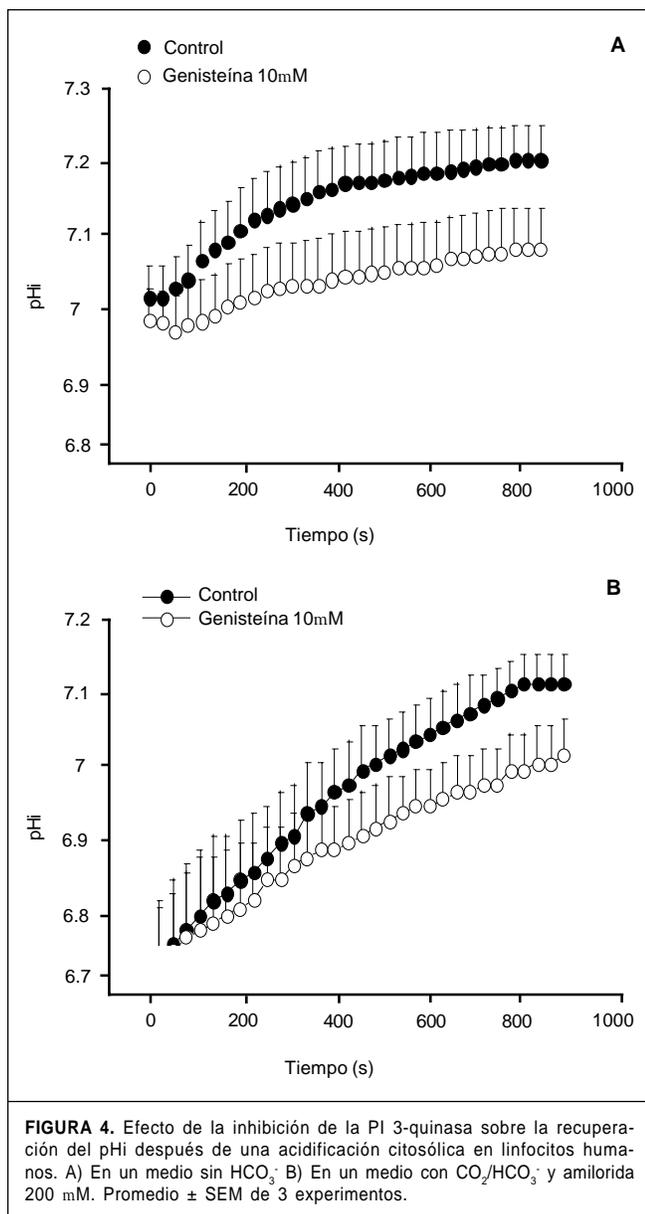
Nuestros resultados indican un efecto positivo de la PKC y negativo de la PKA sobre la actividad del intercambiador Na^+/H^+ de linfocitos humanos (seguramente la isoforma NHE1). Queda pues confirmada, una vez más, la estrecha relación que existe entre el intercambiador Na^+/H^+ y la PKC, así como la falta de uniformidad en el efecto de la PKA. De hecho, se considera que la regulación del NHE1 por PKA es totalmente dependiente del modelo celular estudiado (Noël, 1995) e incluso, en algunos casos, de la técnica de estudio empleada (células en suspensión vs células adheridas) (Azarani, 1995).

Por otro lado, nuestros resultados también indican que el transportador de HCO_3^- es independiente de la actividad de la PKC, e inhibido, al igual que el intercambiador Na^+/H^+ por la PKA. Como hemos dicho antes, existen pocos estudios relacionados con la modulación de la actividad de los diversos



representantes de la familia de transportadores de HCO_3^- , por quinasas de proteína u otras rutas de transducción. Algunos estudios han demostrado una estimulación de la actividad del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ por factores de crecimiento (Ganz, 1989), aunque se desconocen las rutas de transducción que puedan estar implicadas.

También se ha descrito que la actividad del cotransportador $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ puede ser modulada por la ruta del AMPc/PKA (Romero, 1999). Este transportador puede ser estimulado por una elevación del AMPc en células de hígado y páncreas (Álvaro, 1995; Ishiguro, 1996) mientras que, en células renales, la PKA inhibe el cotransporte $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ (Bernardo, 1995; Ruiz, 1992). En células de epitelio biliar, la PKA, pero no la PKC, está involucrada en la ruta de transducción que produce activación del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ independiente de Na^+



en respuesta a un estímulo secretor (Álvaro, 1997). Por lo tanto, nuestros resultados representan una importante aportación al conocimiento sobre la regulación de los transportadores de HCO_3^- , al describir la existencia de un transportador de HCO_3^- , presente en la membrana de linfocitos humanos que es inhibible por PKA e insensible a PKC.

El efecto negativo de la activación de la PKA sobre la actividad de ambos mecanismos responsables de la recuperación del pHi después de una acidificación es también congruente con el efecto inhibitorio que esta quinasa tiene sobre diversos procesos celulares como la proliferación celular, señal intracelular de Ca^{2+} o polimerización de actina en linfocitos humanos (Selliah, 1995; van Tits, 1991). Sin embargo, nuestros resultados no permiten describir adecuadamente los mecanismos o la importancia fisiológica de la inhibición, por par-

te de la PKA, de los transportadores reguladores del pHi.

Otras quinases clave en los mecanismos reguladores y señalizadores de linfocitos humanos, son las quinases de tirosina (PTKs) y la PI 3-quinasa. En las Figuras 3 y 4, se puede observar el efecto que la inhibición de PTK con genisteína y de PI 3-K con wortmanina (30 minutos de preincubación), tiene sobre la recuperación del pHi dependiente de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ y del transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+ .

En ambas figuras se observa que la inhibición de estas quinases produce a su vez una inhibición de la recuperación del pHi tanto en un medio sin HCO_3^- como en uno con HCO_3^- y amilorida. Esto indica que alguna PTK, así como la PI 3-K son de algún modo necesarias para la activación, por medio de una acidificación citosólica, de los transportadores iónicos involucrados en la alcalinización celular. Es poco probable que cualquiera de los dos transportadores iónicos sea diana de PTK o PI 3-K, aunque el cotransportador $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ podría poseer uno o dos sitios susceptibles de fosforilación por PTK (Romero, 1999). Por otro lado, la PI 3-K presenta actividad quinasa sobre proteínas, sin embargo, ésta parece estar restringida a un proceso de autorregulación de la propia enzima (Shepherd, 1996). Por tanto, el efecto de PTKs y PI 3-K sobre la actividad de los transportadores iónicos debe ser indirecto.

Algunos estudios han demostrado que PI 3-K (Ma, 1994) y PTKs (Fukushima, 1996; Kobayashi, 2000) están involucradas en la activación del intercambiador NHE1 por diversos estímulos extracelulares, así como por choque osmótico (Grinstein, 1985a). Sin embargo, en nuestros resultados hemos observado que estas quinases también pueden modificar la actividad del intercambiador cuando éste es activado por acidificación intracelular; además, su efecto no es específico sobre el intercambiador Na^+/H^+ , sino que inhiben por igual al transportador de HCO_3^- .

Un mecanismo por el cual la inhibición de la PI 3-quinasa puede reducir la actividad de la isoforma NHE3 del intercambiador Na^+/H^+ , independientemente de estímulos extracelulares, es mediante la inhibición de la exocitosis de las proteínas intercambiadoras, que normalmente son endocitadas y luego recicladas a la membrana plasmática (Kurashima, 1998). Este mecanismo bien podría explicar los resultados aquí descritos, ya que se sabe que la PI 3-K está estrechamente relacionada con las PTK, de hecho, se ha propuesto que la isoforma b del intercambiador Na^+/H^+ , nativa de eritrocitos de trucha (Guizouarn, 1995), así como la isoforma 1 de la línea celular epitelial Caco-2 (Watson, 1992) pueden ser regulados mediante un proceso de reciclado entre la membrana plasmática y vesículas endocíticas, similar al descrito para el NHE3. Por lo tanto, es posible que la interacción de PI 3-K y PTKs con elementos del citoesqueleto (responsable de los procesos de tráfico vesicular), que a su vez interaccionen con los transportadores iónicos, sea la causa del efecto inhibitorio aquí observado.

En conclusión, los resultados aquí presentados muestran que el intercambiador Na^+/H^+ de linfocitos humanos es estimulado por PKC e inhibido por PKA; mientras que el transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+ es independiente de PKC pero inhibido por PKA. Asimismo, la inhibición de PTKs y PI 3-quinasa inhiben ambos mecanismos reguladores del pH_i cuando son activados por una acidificación citosólica.

REFERENCIAS

- Alfonso, A., Botana, M. A., Vieytes, M. R., y Botana, L. M. (1994). "Functional characterization of the Na^+/H^+ exchanger in rat mast cells: crosstalks between different kinase pathways". *Eur. J. Pharmacol.*, 267, 289-296.
- Alper, S. L. (1994). "The band 3-related AE anion exchanger gene family". *Cell. Physiol. Biochem.*, 4, 265-281.
- Alvaro, D., Guardia, P. D., Bini, A., Gigliozzi, A., Furfaro, S., La Rosa, T., Piat, C. y Capocaccia, L. (1995). "Effect of glucagon on intracellular pH regulation in isolated rat hepatocyte couplets". *J. Clin. Invest.*, 96, 665-675.
- Alvaro, D., Mennone, A. y Boyer, J. L. (1997). "Role of kinases and phosphatases in the regulation of fluid secretion and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in cholangiocytes". *Am. J. Physiol.*, 273, G303-G313.
- Azarani, A., Orłowski, J. y Goltzman, D. (1995). "Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide activate the Na^+/H^+ exchanger NHE-1 isoform in osteoblastic cells (UMR-106) via a cAMP-dependent pathway". *J. Biol. Chem.*, 270, 23166-23172.
- Bernardo, A. A., Kear, F. T., Stim, J. A., Qiu, Y. Y., Ruiz, O. S., Weidman, H. y Arruda, J. A. (1995). "Renal cortical basolateral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter. III. Evidence for a regulatory protein in the inhibitory effect of protein kinase A". *J. Membrane Biol.*, 145, 67-74.
- De la Rosa, L. A., Cabado, A. G., Botana, M. A., Vieytes, M. R., Vidal, J. I. y Botana, L. M. (1999). "Evidence for an electrogenic, negatively protein-kinase-A-modulated, Na^+ -dependent HCO_3^- transporter in human lymphocytes". *Pflügers Arch.*, 437, 935-943.
- Fukushima, T., Wadell, T. K., Grinstein, S., Goss, G. G., Orłowski, J. y Downey, G. P. (1996). " Na^+/H^+ exchange activity during phagocytosis in human neutrophils: role of Fcγ receptors and tyrosine kinases". *J. Biol. Chem.*, 271, 1037-1052.
- Ganz, M. B., Boyasky, G., Sterzel, R. B. y Boron, W. F. (1989). "Arginine-vasopressin enhances pH_i regulation in the presence of HCO_3^- by stimulating three acid-base transport systems". *Nature*, 337, 648-651.
- Grinstein, S., Cohen, S., Goetz, J. D. y Rothstein, A. (1985). "Osmotic and phorbol ester-induced activation of Na^+/H^+ exchange. Possible role of protein phosphorylation in lymphocyte volume regulation". *J. Cell. Biol.*, 101, 269-276.
- Grinstein, S., Cohen, S., Goetz, J. D., Rothstein, A. y Gelfand, E. W. (1985). "Characterization of the activation of Na^+/H^+ exchange in lymphocytes by phorbol esters: change in cytoplasmic pH dependence of the antiport". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1429-1433.
- Grinstein, S., y Dixon S. J. (1989). "Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation". *Physiol. Rev.*, 69, 417-481.
- Grinstein, S., y Foskett, J. K. (1990). "Ionic mechanisms of cell volume regulation in leukocytes". *Annu. Rev. Physiol.*, 52, 399-414.
- Grinstein, S., Goetz, J. D., Stewart, D., Beresford, B. J. y Mellors, A. (1986). "Protein phosphorylation during activation of Na^+/H^+ exchange by phorbol esters and by osmotic shrinking. Possible relation to cell pH and volume regulation". *J. Biol. Chem.*, 261, 8009-8016.
- Guizouarn, H., F. Borgesse, B. Pellissier, F. Garcia-Romeu, and R. Motais. Regulation of Na^+/H^+ exchange activity by recruitment of new Na^+/H^+ antiporters: effect of calyculin A. *Am. J. Physiol.* 268: C434-41, 1995.
- Ishiguro, H., Steward, M. C., Wilson, R. W. y Case, R. M. (1996). "Bicarbonate secretion in interlobular ducts from guinea-pig pancreas". *J. Physiol.*, 495, 179-191.
- Kandasamy, R. A., Yu, F. H., Harris, R., Boucher, A., Hanrahan, J. W. y Orłowski, J. (1995). "Plasma membrane Na^+/H^+ exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsible to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways". *J. Biol. Chem.*, 270, 29209-29216.
- Kobayashi, Y., Pang, T., Iwamoto, T., Wakabayashi, S. y Shigekawa, M. (2000). "Lithium activates mammalian Na^+/H^+ exchangers: isoform specificity and inhibition by genistein". *Pflügers Arch.*, 439, 455-462.
- Kurashima, K., Szabó, E. Z., Lukacs, G., Orłowski, J. y Grinstein, S. (1998). "Endosomal recycling of the Na^+/H^+ exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway". *J. Biol. Chem.*, 273, 20828-20836.
- Levine, S. A., Montrose, M. H., Tse, C. M. y Donowitz, M. (1993). "Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na^+/H^+ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line". *J Biol Chem*, 268, 25527-25535.
- Ma, Y. H., Reusch, H. P., Wilson, E., Escobedo, J. A., Fantl, W. J., Williams, L. T. e Ives, H. E. (1994). "Activation of Na^+/H^+ exchange by platelet-derived growth factor involves

- phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C γ ". *J. Biol. Chem.*, 269, 30734-30739.
- Madshus, I. H. (1988). "Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells". *Biochem. J.*, 250, 1-8.
- Noël, J., Pouysségur, J. (1995). "Hormonal regulation, pharmacology and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms". *Am. J. Physiol.*, 268, C283-C296.
- Ozaki, Y., Matsumoto, Y., Yatomi, Y., Higashihara, M. y Kume, S. (1990). "Modification of Na⁺/H⁺ Exchanger in Human Platelets by 1,2-Dioctanoylglycerol, a Protein Kinase-C Activator". *Thromb Haemost.*, 64, 165-171.
- Paris, S. y Pouysségur, J. (1984). "Growth factors activate the Na⁺/H⁺ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H⁺". *J. Biol. Chem.*, 259, 10989-10994.
- Redon, J., Battle, D. (1994). "Regulation of intracellular pH in the spontaneously hypertensive rat. Role of bicarbonate-dependent transporters". *Hypertension*, 23, 503-512.
- Romero, M. F., y Boron, W. F. (1999). "Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology". *Annu. Rev. Physiol.*, 61, 699-723.
- Romero, M. F., Henry, D., Nelson, S., Harte, P. J., Dillon, A. y Sciortino, C. M. (2000). "Cloning and characterization of a Na⁺-driven anion exchanger (NDAE1)". *J. Biol. Chem.*, 275, 24552-24559.
- Ruiz, O. S., y Arruda, J. A. (1992). "Regulation of the renal Na-HCO₃ cotransporter by cAMP and Ca-dependent protein kinases". *Am. J. Physiol.*, 262, F560-F565.
- Schulte, E. A., Hohendahl, A., Stegemann, H., Hirsch, J. R., Saleh, H. y Schlatter, E. (1999). "Natriuretic peptides and diadenosine polyphosphates modulate pH regulation of rat mesangial cells". *Cell. Physiol. Biochem.*, 9, 310-322.
- Selliah, N., Bartik, M. M., Carlson, S. L., Brooks, W. H. y Roszman, T. L. (1995). "cAMP accumulation in T-cells inhibits anti-CD3 monoclonal antibody-induced actin polymerization". *J. Neuroimmunol*, 56, 107-112.
- Shepherd, P. R., Reaves, B. J. y Davidson, H. W. (1996). "Phosphoinositide 3-kinases and membrane traffic". *Trends Cell. Biol.*, 6, 92-97.
- Siczkowski, M., Davies, J. E. y Ng, L. L. (1994). "Activity and density of the Na⁺/H⁺ antiporter in normal and transformed human lymphocytes and fibroblasts". *Am. J. Physiol.*, 267, C745-C752.
- Teipel, M., Nesbit, O., Tokmak, F. y Zidek, W. (1998). "Sodium-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in patients with chronic renal failure: correlation with renal function". *Kidney Int.*, 53, 432-438.
- Thomas, J. A., Buchsbaum, R. N., Zimniak, A. y Racker, E. (1979). "Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ". *Biochemistry*, 18, 2210-2218.
- Tsao, N., y Lei, H. Y. (1996). "Activation of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter, Na⁺/HCO₃⁽⁻⁾/CO₃⁽²⁻⁾ cotransporter or Cl⁽⁻⁾/HCO₃⁽⁻⁾ exchanger in spontaneous thymocyte apoptosis". *J. Immunol.*, 157, 1107-1116.
- Tse, M., Levine, S., Yun, C., Brant, S., Counillon, L. T., Pouysségur, J. y Donowitz, M. (1993). "Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family". *J. Membrane Biol.*, 135, 93-108.
- van Tits, L. J. H., Michel, M. C., Motulsky, H. J., Maisel, A. S. y Brodde, O. E. (1991). "Cyclic AMP counteracts mitogen-induced inositol phosphate generation and increases in intracellular Ca²⁺ concentrations in human lymphocytes". *Br. J. Pharmacol.*, 103, 1288-1294.
- Watson, A. J. M., Levine, S., Donowitz, M. y Montrose, M. (1992). "Serum regulates Na⁺/H⁺ exchange in Caco-2 cells by a mechanism which is dependent on F-actin". *J. Biol. Chem.*, 267, 956-962.

COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS SÉRICOS EN Individuos con curva de glucosa oral alterada y diabéticos

Rosa María López Durán,^{*} Alma Guadalupe Arellano Meneses^{**} y Gloria Ruiz Guzmán^{***}

La diabetes mellitus es la alteración metabólica más frecuente tanto en el ámbito mundial como nacional. Se ha observado que los sujetos diabéticos presentan alteraciones en los niveles de lípidos sanguíneos, las cuales, unidas a los altos niveles de glucosa en sangre, se asocian con un mayor riesgo cardiovascular. Se ha considerado que la intolerancia a la glucosa está asociada con alteraciones en los lípidos sanguíneos. El objetivo de este trabajo fue determinar si los individuos con intolerancia a la glucosa presentan niveles alterados de lípidos en comparación con sujetos normales y diabéticos. Se realizaron mediciones séricas de colesterol, triglicéridos, HDL-C y LDL-C en 131 individuos y se determinó si eran normales, intolerantes o diabéticos. El 48% de la población fue normal, 37% presentó intolerancia a la glucosa y el 15% fueron diabéticos. El 44% presentó uno o más valores de lípidos alterados. Al comparar los grupos, se encontró que no existen diferencias en la frecuencia de alteraciones en los niveles de colesterol, pero sí en los de triglicéridos, que son más frecuentes en los diabéticos, y en el HDL-C, que se encuentra alterado tanto en los diabéticos como en los intolerantes. Lo que indica que estos últimos se encuentran en un estado metabólico diferente al de los otros dos grupos y hace evidente la necesidad del diagnóstico y tratamiento oportuno para retrasar el desarrollo de la diabetes mellitus y reducir los riesgos que estas alteraciones conllevan.

INTRODUCCIÓN

Los organismos tienden a regular su metabolismo cuando se da una variación en las entradas y salidas de materia y energía. La entrada es esporádica (ingestión) y la salida es continua (metabolismo basal, termogénesis, trabajo físico), esto hace necesario almacenar parte de la energía en forma de carbohidratos, lípidos y proteínas. La regulación de estas reservas constituye el denominado balance energético (Palacios y col., 1996). Para lograr un óptimo balance energético, el organismo emplea los niveles de los carbohidratos y los lípidos a través del metabolismo intermediario en el que están implicados sistemas enzimáticos que están regulados finamente por acción hormonal. La alteración en el balance energético puede traer consigo distintas patologías, entre ellas, la diabetes *mellitus*.

Dicho padecimiento puede estar determinado genéticamen-

te, o bien, puede ser inducido por drogas, infecciones o respuestas autoinmunes. En pacientes con diabetes *mellitus* ocurren anomalías en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, que se asocian a un aumento excesivo del contenido de glucosa en sangre (hiperglucemia), la cual es el resultado de ciertas fallas en la secreción y/o acción de la insulina.

En esto último están involucrados diversos procesos patogénicos como la destrucción de las células b del páncreas por respuesta autoinmune, provocando una inadecuada secreción de la insulina, o bien, alteraciones en los receptores superficiales específicos para la hormona que están presentes en órganos blancos en los que se produce una resistencia a la acción de la misma. Cabe mencionar, que ambas alteraciones pueden ocurrir en un individuo, aunque no se ha determinado si es la causa primaria del exceso de la glucosa en la sangre.

* Bióloga Experimental. Toxicología. Correo electrónico: asorairam-zepol@correoweb.com

** Bióloga, Citogenética. Correo electrónico: agam@xanum.uam.mx

*** Maestría en Investigación en Salud Pública. Correo electrónico: Ryoyis@aol.com. Adscripción: Laboratorio de Investigación Clínico-Epidemiológica.

Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. Rafael Atlixco No.186. C. P. 09340. Delegación Iztapalapa, Distrito Federal. México.

1A. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES *MELLITUS*

Para conseguir un manejo clínico adecuado de los pacientes diabéticos, es un requisito indispensable el uso de un sistema de clasificación que permita identificar y diferenciar sus distintas formas y estadios. La más reciente clasificación de la diabetes considera la existencia de cuatro grupos principales:

- I. Diabetes tipo 1 (la destrucción de células b conlleva a una deficiencia total en insulina).
- II. Diabetes tipo 2 (incluye desde un amplio intervalo de la resistencia a la insulina asociada con una deficiencia relativa en insulina, hasta un defecto predominante en la secreción relacionado con la resistencia a la insulina).
- III. Otros tipos específicos (defectos genéticos en la función de las células b, defectos genéticos en la acción de la insulina).
- IV. Diabetes *mellitus* gestacional.

Un punto importante a tomar en cuenta en los pacientes diabéticos, es el comportamiento del nivel de hiperglucemia durante el transcurso de la enfermedad. En cada uno de los tipos de diabetes, se observan requerimientos específicos de insulina para lograr un idóneo control glucémico. En algunos individuos diabéticos se observa una reducción de peso corporal, ejercicio, y/o agentes hipoglucemiantes, no siendo indispensable el uso de insulina. Otros pacientes tienen una secreción marginal de insulina y requieren de la administración exógena, mientras que en aquellos en los que ha habido muerte masiva de células b pancreáticas, es necesaria la administración de insulina para su supervivencia.

1B. LOS SÍNTOMAS Y RASGOS CLÍNICOS CARACTERÍSTICOS EN PACIENTES CON DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

Esta forma de diabetes, previamente denominada como diabetes no insulino-dependiente o diabetes del adulto, se usa para describir el padecimiento de individuos que presentan resistencia a la insulina. La hiperglucemia podría deberse a un aumento contenido de insulina, que podría estar asociado a una funcionalidad normal de las células b. Aunque la secreción de insulina podría ser defectuosa e insuficiente para compensar la resistencia a la misma.

Esta variedad de diabetes frecuentemente se mantiene sin diagnosticarse por muchos años, debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente, razón por la cual en los primeros estadios no llega a ser severa para alarmar al paciente con algún síntoma tradicional de este padecimiento. La hiperglucemia está asociada con daños a largo plazo, disfunción y falla en varios órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos.

En los individuos con diabetes tipo 2 se ha observado que muestran predisposición para padecer enfermedades corona-

rias, infartos y padecimientos vasculares periféricos, en relación con la población no diabética. Esto en parte, relacionado con dislipidemias e hipertensión (Haffner, 1998). Igualmente, la mayoría de los sujetos están obesos. La obesidad por sí misma causa algún grado de resistencia a la insulina. Los pacientes que no están obesos por el criterio tradicional de peso, muestran la grasa corporal distribuida predominantemente en la región abdominal (Howard, 1987).

1C) FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

La correlación de un factor de riesgo y el desarrollo de la diabetes nunca es del 100%. No obstante, la probabilidad con la que un individuo desarrollará este padecimiento depende de los factores de riesgo a los que esté expuesto. En una población abierta, cuando el muestreo se realiza al azar, la probabilidad de identificar a un individuo asintomático es muy baja, y es contraria en grupos de riesgo.

Las probabilidades de padecer diabetes aumentan con: la edad, la obesidad, la falta de actividad física, hipertensión o anomalías en el metabolismo de lípidos, y varía en subgrupos étnicos. La genética de esta forma de diabetes es compleja y no está completamente definida. Sin embargo, los informes muestran que existe una mayor predisposición genética que para la diabetes *mellitus* tipo 1.

1D) LA DIABETES EN NUESTRO PAÍS Y LA RELEVANCIA DE SU ESTUDIO

La diabetes *mellitus* es la alteración metabólica más frecuente en el mundo con una prevalencia entre 1% y 5%. En México, la prevalencia e incidencia se encuentra entre las más altas del mundo. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, la prevalencia de la diabetes *mellitus* no insulino-dependiente (DM TIPO 2) es de 8.2% en sujetos mexicanos con edades de entre 20 y 60 años (Comité Report, 2000).

Debido a las características de la enfermedad, las repercusiones sociales y económicas para el país son enormes. Las complicaciones crónicas de la enfermedad pueden incapacitar al paciente para continuar siendo un sujeto productivo. Por otro lado, la presencia común de diabetes *mellitus* e hipertensión acelera el proceso aterosclerótico. Existen otros factores implicados en este proceso, bien podríamos mencionar: alteración del metabolismo de las grasas, sobrepeso, hiperinsulinismo e insulino-resistencia, así como cambios en la agregación plaquetaria y la coagulación de la sangre.

En las personas con diabetes, la prevención de estas complicaciones se puede lograr con la disminución de cifras altas de glucosa sanguínea a niveles cercanos a lo normal y con la normalización de las grasas sanguíneas (colesterol y triglicéridos). Cada uno de estos cambios significa un factor de riesgo independiente para la generación de una cardiopatía coronaria en los no diabéticos (Garner, 1998).

La incidencia de cardiopatía aterosclerosa (CAE) se relaciona directamente con las concentraciones sanguíneas de colesterol total y del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) e inversamente con los valores del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL). La relación de la hipertrigliceridemia con la CAE parece deberse a la asociación de la elevación de los triglicéridos con valores bajos de C-HDL y con formas aterógenas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Posadas, 1995).

El análisis de la situación de salud en México muestra evidencias de la necesidad de conocer la distribución y frecuencia de las alteraciones lipoproteicas en la población. Las principales enfermedades causantes de muerte en la población mexicana han tenido modificaciones en el curso del presente siglo. En 1922 la proporción de defunciones por enfermedades infecciosas y parasitarias fue de 32.4%, para 1930 se incrementó a 47% y a partir de ese año se inició su descenso, para ser de 11.6% en 1990. Por el contrario, las proporciones en el caso de enfermedades crónicodegenerativas fueron de 3.3%, 4% y 46.1% para los mismos años. En la actualidad, una de cada dos defunciones es por padecimientos crónicodegenerativos. Más aún, en 1993, las enfermedades del corazón, la diabetes *mellitus* y la enfermedad vascular cerebral, todas ellas estrechamente relacionadas con el metabolismo lipoproteico, ocuparon el segundo, cuarto y quinto lugar, respectivamente, como principales causas de mortalidad (Posadas, 1995).

Por el momento, la diabetes *mellitus* es incurable. Sin embargo, puede ser controlada mediante dieta, ejercicio y medicamentos, esto está encaminado a lograr un mejoramiento en la calidad de vida por medio de la desaparición de los síntomas, la prevención de las complicaciones y la reducción de la mortalidad (Arellano, 1999).

El objetivo del presente estudio fue determinar los niveles de triglicéridos, colesterol y lipoproteínas de alta y baja densidad en el suero de pacientes que presenten curva de tolerancia oral a la glucosa alterada en comparación con los niveles determinados en individuos diabéticos y sujetos normales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se eligió una muestra aleatoria de individuos, los cuales se clasificaron en normales, alterados y diabéticos, de acuerdo con los siguientes criterios:

- Normales: Individuos sin síntomas y signos de diabetes *mellitus*, con o sin antecedentes familiares de la enfermedad, con valores de glucosa en ayuno menores de 110 mg/dL y que no presentaron valores alterados en una prueba de tolerancia oral a la glucosa.
- Alterados: Sujetos sin síntomas y signos de diabetes, con o sin antecedentes familiares, con valores de glucosa en ayuno menores de 110 mg/dL, pero con valores anormales de glucosa en una prueba de tolerancia oral.
- Diabéticos: Individuos previamente diagnosticados que

presentaron síntomas de diabetes y confirmados por estudios de laboratorio.

A los pacientes que no presentaron síntomas de diabetes, pero desconocían si tenían intolerancia a la glucosa, se les realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). Esta prueba consta de los siguientes pasos:

- Se les pidió llevar a cabo una dieta rica en carbohidratos tres días antes de realizar la prueba (300 g adicionales al día) y presentarse con un ayuno de entre 10 y 12 horas.
- Se registraron los siguientes datos: Personales (nombre, dirección, teléfono y ocupación), edad, sexo, peso, talla, diámetro de la cintura y la cadera, tensión arterial y, en caso de haberse sometido a una prueba de tolerancia oral a la glucosa con anterioridad, el tipo de curva obtenido. Con los datos de peso y talla se obtuvo el índice de masa corporal o índice de Quetelet, por medio de la fórmula:

$$IMC = \frac{\text{peso}}{\text{talla}^2}$$

- Se tomó una muestra de sangre capilar por punción dactilar, previa asepsia y antisepsia de la zona.
- Se determinó el nivel de glucosa en sangre completa mediante un método electroquímico (Precision QID de Medisense Abbot, México), para tiras reactivas de glucosa-oxidasa (Precision plus electrodes, Medisense Abbot, México).
- Cuando el valor de glucosa fue mayor de 124 mg/dL, no se realizó la PTOG, ya que este valor es diagnóstico de diabetes. En este caso se pidió a los sujetos regresaran posteriormente para hacer el diagnóstico definitivo.
- Aquellos que presentaron valores normales, se canalizaron por medio de punción de la vena basilica, previa asepsia y antisepsia y se incorporó un equipo de venoclisis con una llave de tres vías (Marca), por medio de la cual se extrajo la muestra sanguínea. La vía permeable se mantuvo con una solución fisiológica isotónica de cloruro de sodio al 0.9% (Abbot, México) a razón de 20 gotas por minuto.
- A través de la llave de tres vías y con ayuda de una jeringa estéril, se tomaron aproximadamente 10 ml de sangre, la cual se centrifugó a 1500 rpm para separar el suero, el cual se utilizó para determinar los niveles de lípidos.
- Se administró una carga oral de 75 g de glucosa para consumo humano de alto grado de pureza, disuelta en 250 ml de agua.
- Se determinó la glucemia a los 30, 60, 90 y 120 min.
- Las curvas obtenidas fueron clasificadas de acuerdo con los criterios sugeridos por la American Diabetes Association (ADA).

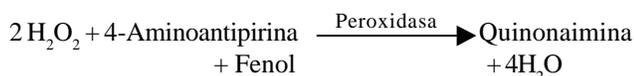
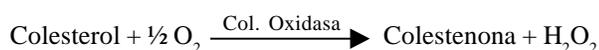
A los sujetos diabéticos y normales se les tomó una muestra de sangre venosa en ayunas de aproximadamente 10 ml con una jeringa estéril, posteriormente se realizaron medicio-

nes de glucosa en sangre completa de la forma descrita anteriormente.

La sangre se centrifugó a 1500 rpm para separar el suero y en él se determinaron los niveles de colesterol, triglicéridos y de lipoproteínas de alta y baja densidad, por medio de los siguientes métodos:

a) Colesterol

La cantidad de colesterol en la muestra, tanto libre como esterificado, se determinó por espectrofotometría, gracias a la formación de un compuesto coloreado que se forma después de una serie de reacciones, las cuales se muestran a continuación:



Para realizar estas reacciones se emplea un reactivo que contiene: Pipes 35 mmol/L, colato sódico 0.5 mmol/L, fenol 28 mmol/L, colesterol esterasa > 0.2U/mL, colesterol oxidasa > 0.1U/mL, peroxidasa > 0.8 U/mL, 4-aminoantipirina 0.5 mmol/L, pH 7.0.

En tubos de ensayo se tomaron alícuotas de 10 mL de muestra (suero) y se le añadió 1mL de reactivo. Se prepararon también un tubo blanco (con 1 ml de reactivo) y un tubo patrón (10 mL de patrón de colesterol + 1 mL de reactivo).

-Se agitaron y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

-Se leyó la absorbancia (A) del patrón y de la muestra frente al blanco a 500 nm.

-Se calculó el contenido de colesterol por medio de la fórmula:

$$\text{Colesterol } \text{mg} / \text{dL} = \frac{A_m}{A_p} \times 200$$

En donde:

Am = Absorbancia de la muestra.

Ap= Absorbancia del patrón.

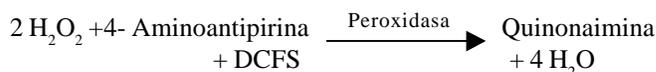
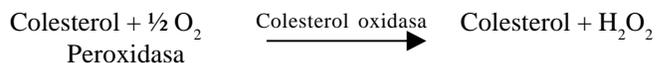
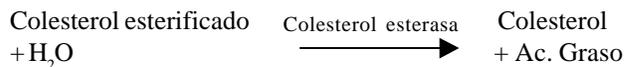
200 mg/dL = Se refiere al patrón de colesterol.

Se consideró que el valor normal de colesterol fuera menor de 200 mg/dL, mientras que un valor entre 200 y 300 mg/dL se consideró dudoso.

b) Colesterol HDL

Al llevarse a cabo la centrifugación del suero sanguíneo, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y de baja densidad (LDL) precipitan en presencia de iones magnesio y fosfotungstato, mientras que las lipoproteínas de alta densi-

dad (HDL) se encuentran en el sobrenadante cuyo contenido de colesterol se cuantificó espectrofotométricamente mediante las siguientes reacciones:



Para llevarse a cabo estas reacciones se emplearon dos reactivos que contenían:

- Reactivo A (50 mL).

- Fosfatos 35 mmol/L, colesterol esterasa > 0.2 U/mL, colesterol oxidasa > 0.1 U/mL, peroxidasa > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0.5 mmol/L, colato sódico 0.5 mmol/L, diclorofenol-sulfonato 4 mmol/L, pH 7.0.

- Reactivo B (50 mL)

- Fosfotungstato 0.4 mmol/L, cloruro de magnesio 20 mmol/L.

- En tubos de ensayo se tomaron alícuotas de 0.2 mL de muestra y 0.5 mL de reactivo B, se agitaron y se centrifugaron a 4000 rpm, colectando el sobrenadante de las muestras.

En tubos de ensayo se tomaron alícuotas de 50 mL de muestra (suero) y se le añadió 1 mL de reactivo A. Se prepararon también un tubo blanco (con 50 ml de agua destilada + 1 mL de reactivo) y un tubo patrón (50 mL de patrón de colesterol HDL + 1mL de reactivo A).

Se agitaron y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se leyó la absorbancia (A) del patrón y de la muestra frente al blanco a 500nm.

Se calculó el contenido de colesterol por medio de la fórmula:

$$\text{Colesterol - HDL } \text{mg} / \text{dL} = \frac{A_m}{A_p} \times 3.5 \times 40$$

En donde:

Am = Absorbancia de la muestra.

Ap= Absorbancia del patrón.

3.5 mg/dL = factor de dilución de la muestra

40 mg/dL = concentración del patrón

Se consideró que los valores normales de C-HDL en hombres oscilaban entre 30-60 mg/dL, en tanto que en las mujeres fluctuaba entre 40-70 mg/dL.

c) Colesterol LDL

El contenido de C-LDL se estimó en función de los otros tres lípidos por medio de la fórmula de Friedewald (Posadas, 1995):

$$\text{C-LDL} = \text{CT} - (\text{C-HDL}) - (\text{TG}/5)$$

Donde:

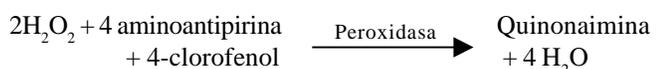
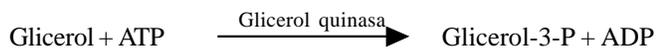
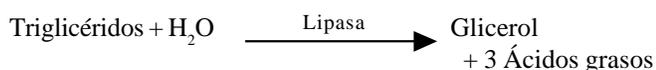
CT = Colesterol total

C-HDL = Colesterol de alta densidad

TG = Triglicéridos

d) Triglicéridos

El método enzimático para la determinación de los triglicéridos requiere de varias reacciones acopladas que generan un producto coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



Para llevarse a cabo estas reacciones se empleó el siguiente reactivo que contenía:

Pipes 40 mmol/L, 4-clorofenol 6 mmol/L, cloruro de magnesio 5 mmol/L, Lipasa > 100 U/mL, Glicerol quinasa > 1.5 U/mL, Glicerol-3-P oxidasa > 4 U/mL, peroxidasa > 0.8 U/mL, 4-aminoantipirina 0.75 mmol/L, ATP 0.9 mmol/L, PH 7.5.

Patrón de triglicéridos. Glicerol equivalente a trioleína 200 mg/dL.

En tubos de ensayo se tomaron alícuotas de 10 mL de la solución patrón de triglicéridos y 1 mL de reactivo. En otros tubos de ensayo se tomaron alícuotas de 10 mL de muestra (suero) y se les añadió 1 mL de reactivo. Por último, se prepararon tubos blancos a los que se le adicionó 1 mL de reactivo.

Se agitaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se leyó la absorbancia (A) del patrón y de la muestra frente al blanco a 500 nm.

Se calculó el contenido de colesterol por medio de la fórmula:

$$\text{Triglicéridos mg / dL} = \frac{Am}{Ap} = 200$$

En donde:

Am = Absorbancia de la muestra.

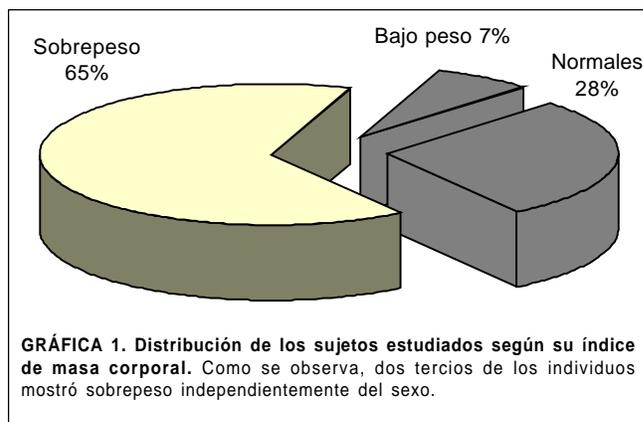
Ap = Absorbancia del patrón.

200 mg/dL = concentración del patrón

Los valores normales de triglicéridos fluctuaban entre 60-150 mg/dL.

RESULTADOS

El número total de muestras analizadas fue de 131, la pobla-

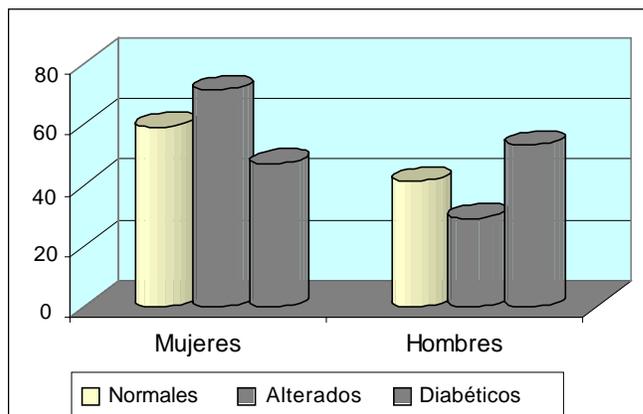


GRÁFICA 1. Distribución de los sujetos estudiados según su índice de masa corporal. Como se observa, dos tercios de los individuos mostraron sobrepeso independientemente del sexo.

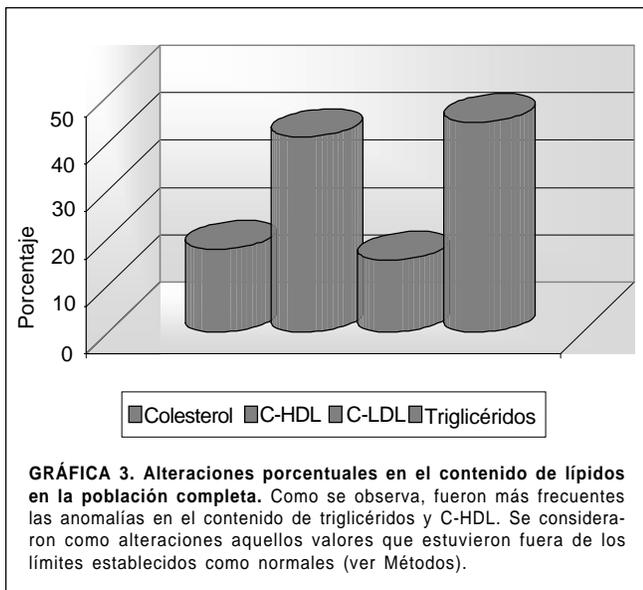
ción de mujeres (82) fue mayor que el número de hombres (49) analizados. En cuanto al índice de masa corporal en la población analizada, como se muestra en la Gráfica 1, el 65% de los individuos estudiados mostraron sobrepeso (obesos y obesidad mórbida) el 28% tuvo valores normales en peso y talla correspondientes a su edad cronológica, y un 7% presentó bajo peso.

La mayor parte de los individuos presentaron sobrepeso, probablemente debido a una alteración en el balance energético, donde un incremento en la ingestión y/o una disminución del gasto energético, se traduce en el aumento del peso corporal.

El análisis de la distribución en obesidad relacionado al sexo, mostró que hubo una mayor proporción de sujetos con sobrepeso entre la población de las mujeres con 59%. En el que 57% presentaron sobrepeso, el 33% obesidad y el 10%



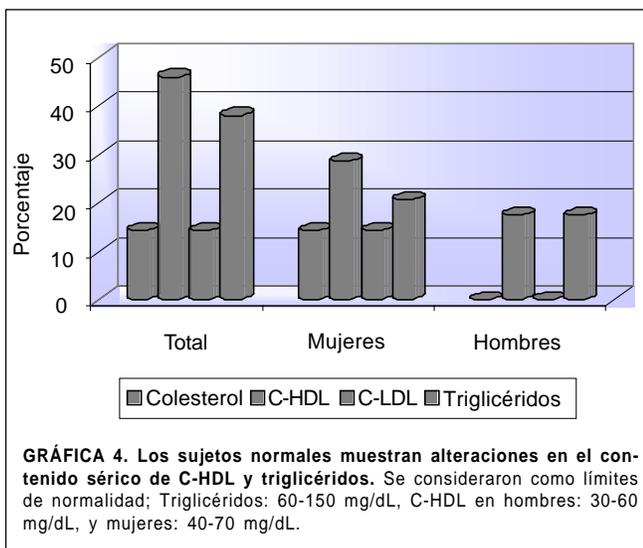
GRÁFICA 2. Distribución de los individuos estudiados teniendo en cuenta sus alteraciones en niveles de glucosa sanguínea. El cual fue determinado mediante un método electroquímico para tiras reactivas de glucosa-oxidasa. Los sujetos normales mostraron valores de glucosa en ayuno menores de 110 mg/dL y que no presentaron valores alterados en una prueba de tolerancia oral a la glucosa. Los individuos alterados fueron aquellos con valores de glucosa en ayuno menores de 110 mg/dL, pero con valores anormales de glucosa en una prueba de tolerancia oral y los sujetos diabéticos fueron aquellos que previamente se les habían establecido signos o síntomas de diabetes y confirmados por estudios de laboratorio.



obesidad mórbida. En cuanto a la población de hombres, se observó que el 67% presentó sobrepeso, el 21% obesidad y el 12% obesidad mórbida.

El mayor porcentaje de individuos se encuentra en sobrepeso, seguido de obesidad, siendo el de menor frecuencia el de obesidad mórbida. Este rasgo físico se debe a una acumulación excesiva de triglicéridos en el tejido adiposo, cuya distribución en los humanos no es homogénea. En el caso de las mujeres se refiere a obesidad ginecoide, que se distribuye en la parte glúteo-femoral. Mientras que en los hombres recibe el nombre de androide, y la acumulación de grasa se concentra en la parte abdominal (Palacios y col., 1996).

Las diferencias en la distribución de grasa entre hombres y mujeres, se debe a la diferencia de estimulación de la lipasa de las lipoproteínas, la cual hidroliza los triglicéridos para almacenarse en el tejido adiposo. Cuando la concentración de



estrógenos es alta, la lipasa de las lipoproteínas se encuentra más activa en la parte glúteo-femoral, mientras que cuando la concentración de testosterona es alta, la enzima se activa en la parte abdominal (Palacios y col., 1996).

El análisis de la distribución y porcentaje de edades de los individuos estudiados, mostró que el 51% de la población se concentró entre las edades de 19 y 39 años, el 28% se encontró entre los 40 y 49 años, el resto una edad mayor de 50 años (21%). La edad entre todos los individuos estudiados osciló entre los 19 y 69 años, dando un valor poblacional promedio de 38.2 ± 12 años.

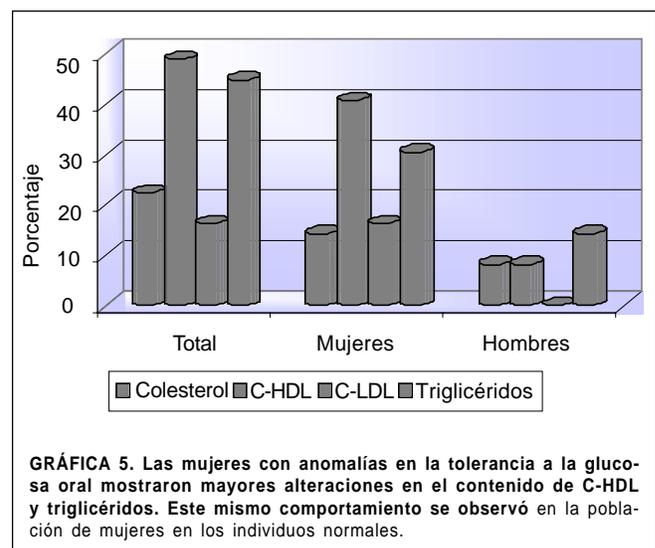
En la Gráfica 2 podemos observar la clasificación de los individuos en tres grupos: normales, alterados y diabéticos. La diferenciación entre los sujetos normales y alterados se dio de acuerdo a un estudio previo realizado de tolerancia oral a la glucosa, mientras que en los diabéticos no se llevó a cabo esta prueba, ya que habían sido diagnosticados con anticipación.

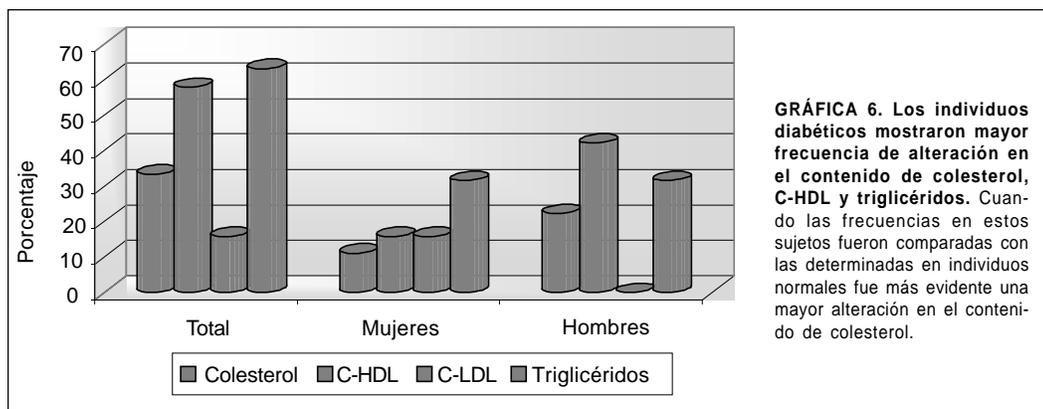
Los individuos normales representaron un 48% (63 individuos) de la población. En tanto, el número de sujetos con curva de tolerancia alterada correspondió un 37% (49 individuos) y los diabéticos representaron un 15% (19 sujetos).

Se observa que hubo más mujeres con curva de tolerancia alterada, y normales que hombres, mientras, que la frecuencia de individuos diabéticos fue similar entre ambos sexos.

El análisis de la distribución de edad en cada grupo de estudio mostró que los individuos diabéticos tuvieron más edad (46 ± 11 años) que los otros dos grupos. Los individuos normales y alterados mostraron una edad promedio similar (37 ± 12 años). Este comportamiento en los sujetos diabéticos confirmó que la edad es un factor de riesgo importante para padecer diabetes *mellitus* tipo 2 (Expert Comité, 2000).

Al realizar un estudio más detallado sobre la distribución de los individuos según su índice de masa corporal, en los sujetos normales, la población de mujeres presentó un mayor porcentaje en cuanto a su peso y talla estándar, mientras que el de menor incidencia fue el de obesidad mórbida, hecho que





contrasta con los hombres, donde hubo una mayor proporción de individuos con sobrepeso, siendo el de menor incidencia el de obesidad mórbida (Gráfica 2).

En los individuos con curva alterada se observó que hubo un comportamiento contrario en los hombres, donde el 50% de la población mostró sobrepeso. No obstante, muestran menor proporción de sujetos con obesidad que las mujeres.

Por último, en cuanto a la distribución de los sujetos diabéticos, se encontró que hubo más mujeres con sobrepeso y obesidad mórbida, mientras, que en hombres se presentó la misma frecuencia tanto en normopeso como en sobrepeso, siendo el de mayor frecuencia el de obesidad.

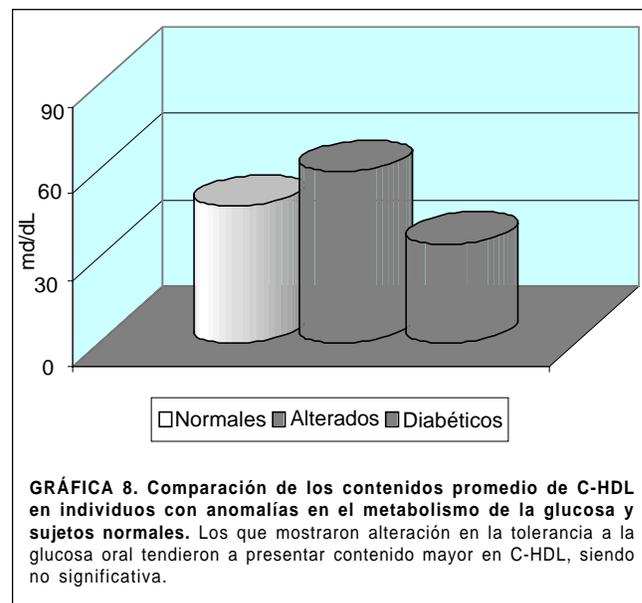
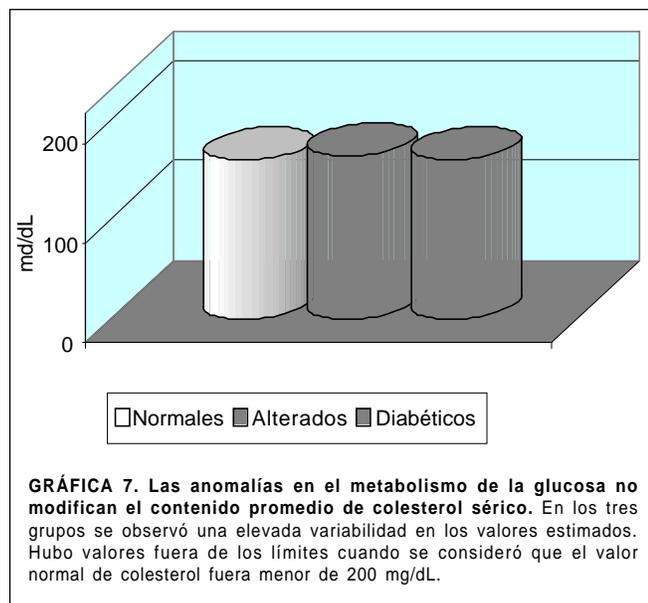
El análisis de los lípidos, teniendo en cuenta la población total, mostró que un tercio de la misma presentó algún valor alterado. Como se muestra en la Gráfica 3, casi la mitad de los individuos estudiados tuvieron alterado el contenido de C-HDL (42%) y triglicéridos (44%), y en menor proporción el contenido total de colesterol (17%) y C-LDL (15%).

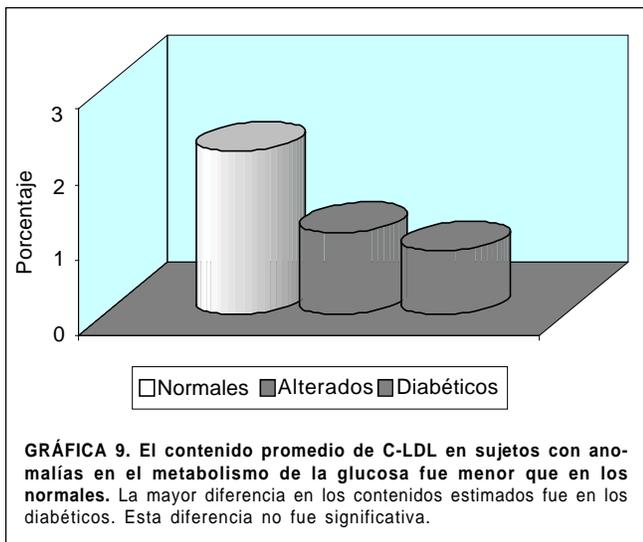
En lo que respecta al comportamiento por grupo. En los individuos normales, como se observa en la gráfica 4, hubo

mayor incidencia en alteraciones en C-HDL y triglicéridos, seguidos por C-LDL y colesterol total. Las mujeres mostraron mayor frecuencia de alteración en cuanto a C-HDL y triglicéridos, mientras que los niveles en colesterol y C-LDL fueron similares. En la población de hombres, los niveles de triglicéridos y C-LDL no mostraron alteración.

Como se observa en la Gráfica 5, en los individuos con curva de tolerancia alterada hubo mayor frecuencia de alteraciones en C-HDL y triglicéridos que en los normales, y en menor medida en el contenido total de colesterol y C-LDL. La comparación entre hombres y mujeres mostró que en este último grupo hubo mayor frecuencia de alteraciones en los lípidos analizados.

En cuanto a los individuos diabéticos, como se puede observar en la Gráfica 6, hubo mayor frecuencia de alteraciones triglicéridos y C-HDL seguidos por colesterol y C-LDL. Los hombres presentaron mayor frecuencia de alteraciones en C-HDL y triglicéridos, mientras que en las mujeres presentan mayor alteración en triglicéridos. Cuando se compararon los grupos, en la población de mujeres se observó mayor altera-



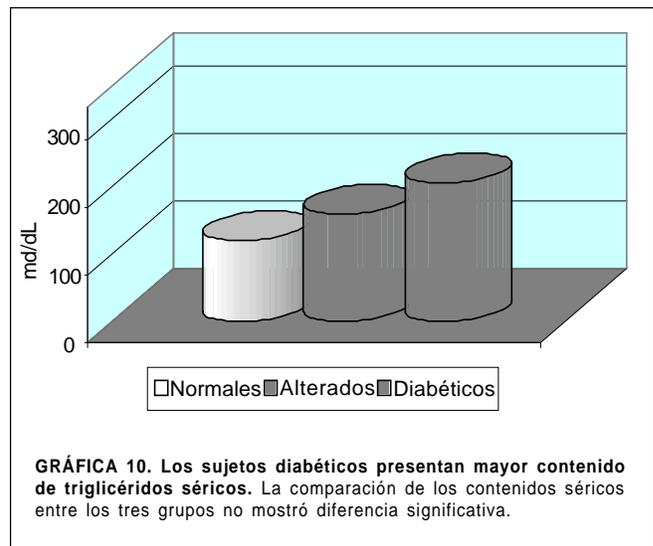


ción en C-LDL.

En la Gráfica 7 se muestra que el contenido promedio de colesterol en los tres grupos estudiados fue similar.

El método enzimático-colorimétrico empleado permitió determinar el contenido del colesterol presente en las lipoproteínas de alta densidad. En la Gráfica 8 se puede observar que en los individuos alterados hubo tendencia a mostrar un mayor contenido de C-HDL, seguido de los normales, mientras que los diabéticos mostraron valores más bajos. Cuando se compararon los grupos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa, quizás debido a la elevada variabilidad en los valores en cada uno de los grupos.

En la Gráfica 9 se puede observar que en los individuos alterados y diabéticos hubo menor contenido de C-LDL que en los sujetos normales. En cuanto al contenido de triglicéridos, hubo una tendencia a presentar niveles mayores en individuos con



curva de tolerancia alterada y diabéticos comparándose con los valores en sujetos normales (ver Gráfica 10).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados encontrados en este estudio, señalan que los diabéticos presentan diferencias en los parámetros estudiados en relación con los normales e intolerantes y que estos últimos se encuentran en un estado diferente al de cualquiera de los otros dos grupos, por lo que es conveniente realizar un seguimiento y tratamiento para tratar de evitar que lleguen a presentar incremento en valores de lípidos y reducir los riesgos que estas alteraciones conllevan.

La obesidad junto con los padecimientos relacionados, es un problema de vanguardia, parte de las interrelaciones entre las enfermedades cardiovasculares, diabetes y otras.

REFERENCIAS

- Arellano M. A. G., Ruiz G. G., Acevedo G. A. y Preciado L. A. (1999). "Diabetes mellitus: importancia del diagnóstico temprano". *Contactos* (32), 5-9.
- Expert Committé on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus (2000). "Report of the Expert Committé on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus". *Diabetes Care* 23 (Supp. 1), S4-S19.
- Garber, A. J. (1998). "Vascular disease and lipids in diabetes". *Med. Clin. North. Am.*, 82, 931-948.
- Haffner, S. M. (1998). "Management of dyslipidemia in adults with diabetes". *Diabetes Care* 21, 160-178.
- Hermann H. (1997). *Hiperglicemia e Hiperinsulinemia*. Progresos en la medicina libros de bolsillo para clínica y consultorio, cortesía BAYER.
- Howard, B. (1987). "Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus". *J. Lipid. Res.*, 28, 613-628.
- Palacios, E., Racotta, I.S. y Racotta, R. (1996). "Obesidad, resistencia a la insulina y asociación con enfermedades". *Ciencia* 30, 274-281.
- Pérez, P. E. (1997). *Manual para el paciente con diabetes mellitus*. 3ª ed. México: Ed. Foli de México. Pp. 1-52.
- Pérez, P. E. (1997). *Guía para el educador en diabetes*. 2ª ed. México: Ed. Foli México. Pp. 10-70.
- Posadas R. C. (1995). *Dislipidemias y aterosclerosis*. México Ed. Interamericana-McGraw-Hill.
- Zorrilla H. E. (1995). *Hipercolesterolemia diagnóstico y tratamiento*. 2da edición. México: Ed. Interamericana Mc Graw -Hill.

INFLUENCIA DE LOS EFECTOS ELECTROSTÁTICOS EN

La complejación del 2-naftalensulfonato por derivados de ciclodextrinas

Fernando López de las Heras,* José Vázquez Tato** y Emilio Álvarez Parrilla***

En el presente trabajo se estudió la influencia de las interacciones electrostáticas sobre la complejación de la molécula aniónica 2-naftalensulfonato por dos aminoderivados de la β -ciclodextrina. Estos estudios sugieren que, en función de la posición del grupo amino en la ciclodextrina, las interacciones electrostáticas entre este grupo y el grupo sulfonato pueden tener una influencia positiva o negativa sobre la fortaleza de los complejos formados.

INTRODUCCIÓN

El reconocimiento molecular es un proceso físico que se basa en la asociación de dos o más moléculas que se mantienen unidas por fuerzas no covalentes tales como interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. Estos procesos presentan aplicaciones muy importantes en las ramas de la ciencia: farmacéuticas, biomédicas y químicas (Inoue, 1993).

Dentro de los procesos de reconocimiento molecular, resultan especialmente interesantes los denominados procesos de inclusión o procesos tipo *host-guest*, en los cuales una de las moléculas implicadas denominada hospedador o receptor, presenta ciertas propiedades estructurales que le permiten albergar en su interior a otras moléculas (o a parte de las mismas) denominadas genéricamente como moléculas huésped.

Existen varios sistemas conocidos que son capaces de desarrollar procesos de inclusión. Los hay de origen inorgánico (zeolitas, caolitas, clatratos, etc.), de origen orgánico (ciclodextrinas, éteres corona, criptandos, etc.), así como macromoléculas de origen biológico (enzimas, biomembranas, almidón, etc.) (Saenger, 1980).

De entre todas ellas, destacan las ciclodextrinas, ya que el estudio de los procesos de inclusión en los que participan puede proporcionar valiosa información sobre las fuerzas de interacción intermoleculares no covalentes que participan en procesos enzimáticos, motivo por el cual han sido ampliamente utilizadas como modelos para explicar el proceso de reco-

nocimiento molecular en sistemas enzimáticos o de catalizadores (Saenger, 1980).

Las ciclodextrinas son un conjunto de moléculas cíclicas naturales, constituidas por 6, 7 u 8 unidades de α -D-glucosa unidas entre sí por enlaces glicosídicos $\alpha(1,4)$, que se denominan α -, β - y γ -ciclodextrina (α -, β - y γ -CD), respectivamente (Figura 1a), que se obtienen a partir de la degradación enzimática del almidón por la acción de la enzima ciclodextrintransglicosilasa (CTGasa) (producida por *Bacillus macerans*) (Szejtli, 1999).

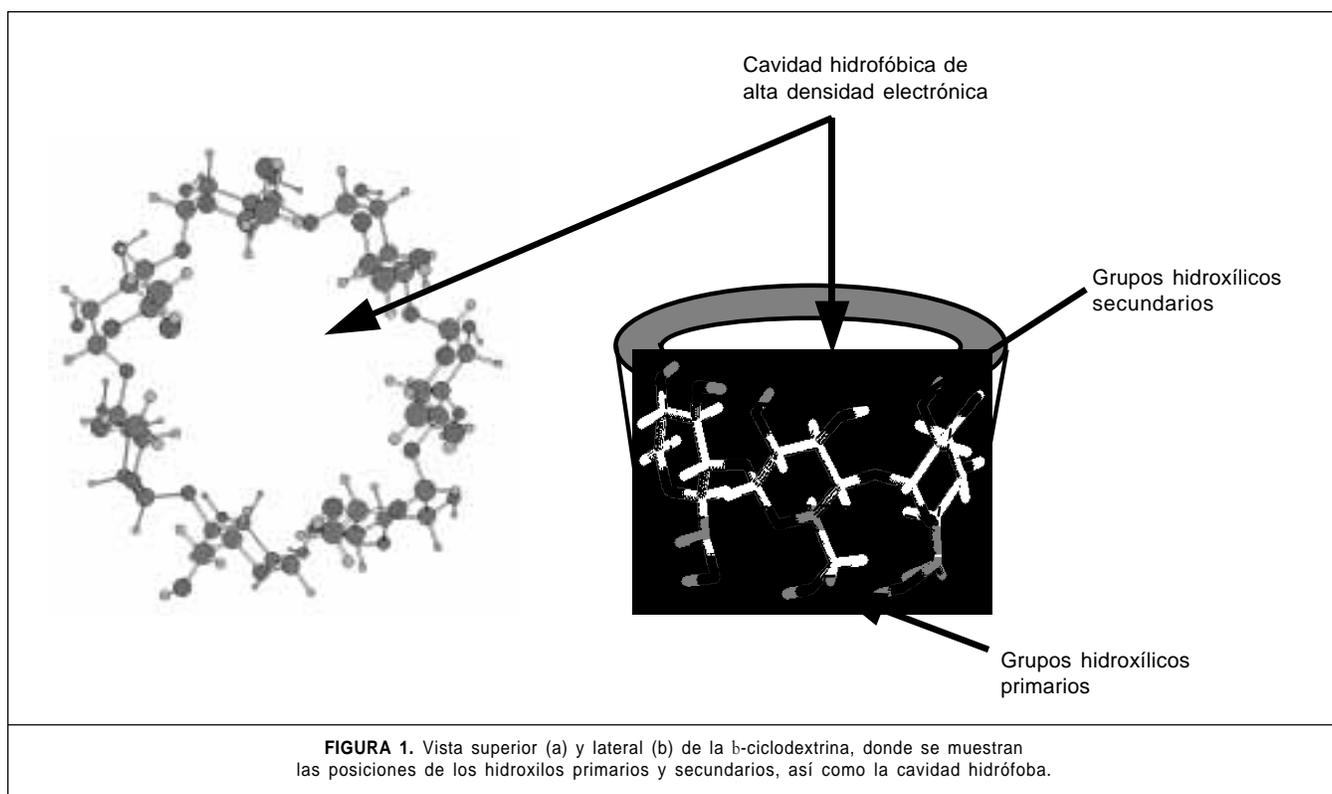
Como consecuencia de la conformación silla 4C_1 de las unidades de glucosa unidas por los enlaces glicosídicos, las ciclodextrinas poseen una conformación tridimensional en forma de cono truncado, en la que todos los hidroxilo primarios (carbono 6) de las unidades de glucosa están situados en uno de los bordes del cono (parte estrecha del mismo) y todos los hidroxilo secundarios (carbonos 2 y 3) en el otro (parte ancha), tal como se observa en la Figura 1b. Asimismo, los hidrógenos de los carbonos 3, 5 y 6 y los pares de electrones libres de los oxígenos de los enlaces glicosídicos (entre los carbonos 1 y 4) se encuentran orientados hacia el interior de la cavidad, lo que le confiere un carácter marcadamente hidrófobo, con una gran densidad electrónica que otorga a estas moléculas un cierto carácter de bases de Lewis (Szejtli, 1999).

Esta doble característica que presentan las ciclodextrinas (por un lado una cavidad hidrófoba, y por el otro la existencia de los dos anillos hidrófilos, que le confieren al exterior de

* Estudiante de Ingeniería Técnico Industrial, especialidad Química Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad de Santiago de Compostela.

** Doctor en Ciencias Químicas. Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela.

*** Doctor en Ciencias Químicas. Departamento de Ciencias Básicas, Academia de Química, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Anillo Envoltente del Pronaf y Estocolmo s/n, 32300, Cd. Juárez, Chih., México. Tel. (52) 1 688 1800 ext. 1984. Fax (52) 1 688 18 21. Correo electrónico: ealvarez@uacj.mx



la ciclodextrina un carácter polar) hace que estas moléculas posean la capacidad de albergar moléculas orgánicas en su interior mediante la formación de complejos de inclusión. En la Figura 2 se representa, de manera esquemática, la formación de un complejo de inclusión.

Durante el proceso de formación del complejo de inclusión ocurren varios procesos: a) Una 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 alcanza 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) (Easton y Lincoln, 1999).

De manera general se da por sentado que la estabilidad y estructura de los complejos formados depende fundamentalmente de factores geométricos y de polaridad (Easton y Lincoln, 1999; Saenger, 1980; Szejtli, 1988).

Sin embargo, al analizar los procesos de reconocimiento molecular presentes en la naturaleza (procesos enzimáticos, reacciones catalíticas), se observa que las interacciones electrostáticas entre el receptor y la molécula huésped son un factor preponderante. En este contexto, algunos autores han desarrollado estudios de complejación entre derivados ióni-

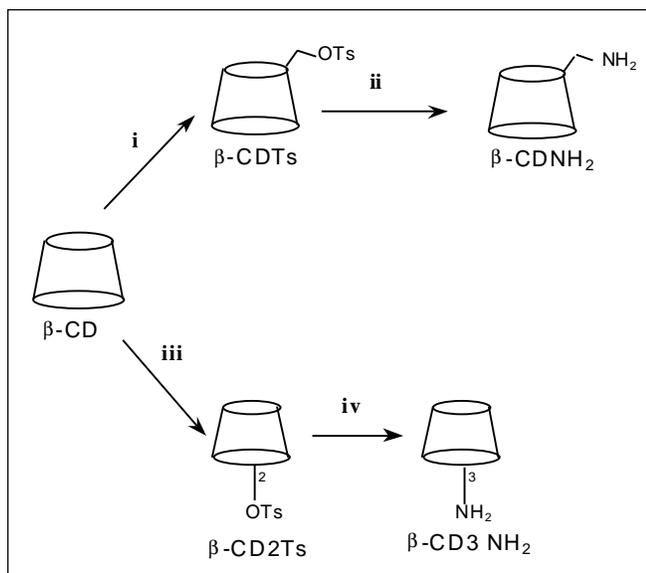
cos de ciclodextrinas con moléculas huésped iónicas, en los que han demostrado que las interacciones electrostáticas entre ambos grupos iónicos juegan un papel importante en la estructura y fortaleza de los complejos formados (Álvarez-Parrilla y col. 2001; Brown y col., 1994; Brown y col., 1995; Easton y Lincoln, 1999; Frago y col., 1997; Matsui y Okimoto, 1978; Setter y col., 1990; Ramos Cabrer y col., 1999; Sandow y col., 1999; Singh y col., 1999).

En este contexto, el objetivo del presente trabajo de investigación es estudiar la influencia de las interacciones electrostáticas, debidas a la presencia de un grupo amino en posiciones 3 y 6 de la β -ciclodextrina, en la complejación del 2-naftalensulfonato (2-NS), mediante técnicas de resonancia magnética nuclear.

METODOLOGÍA

A) Reactivos e instrumental

La β -ciclodextrina (donada por Roquette, Francia) se secó a vacío a 60°C sobre pentóxido de fósforo (P_2O_5) hasta peso constante. El cloruro de *p*-toluensulfonilo (TsCl) PRS (Aldrich) se recristalizó de hexano/cloroformo. La piridina se secó mediante una doble destilación sobre NaOH, la *N,N'*-dimetilformamida (DMF) se mantuvo con agitación con CaH_2 durante 18 h seguido de destilación a presión reducida. Todos los demás reactivos fueron adquiridos a las casas comerciales SIGMA, Aldrich, Fluka y Panreac de calidad QP o PRS y utili-



ESQUEMA 1. Esquema general de la síntesis de derivados monoméricos desarrollada en el presente trabajo

zados sin purificación previa. **Cromatografía en capa fina (TLC):** Como soporte se utilizaron láminas de aluminio recubiertas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Las placas se revelaron por inmersión en los siguientes reveladores: a) H₂SO₄ al 5% en metanol, b) Ninhidrina al 0,2% en etanol; seguido de calentamiento. Fases móviles: A) Acetato de etilo: 2-propanol: agua 7:7:5, B) Acetato de etilo: 2-propanol: agua: NH₄OH al 25% 2:3:4:0,3. **Cromatografía de intercambio iónico:** se utilizó una matriz Carboximetil-Sephadex C-25 (Pharmacia), como fase móvil se empleó, primero agua destilada y, a continuación bicarbonato amónico 0,1-0,2 M. **Punto de fusión:** El punto de fusión se determinó en un instrumento Gallempkamp. Las muestras fueron recristalizadas en agua para la determinación del punto de fusión, los valores no están corregidos. **Espectroscopía de Masas:** Los espectros de masas de ionización por electrospray en modo positivo y negativo fueron registrados en un espectrómetro HP 1000 LC/MS, con un intervalo de fraccionador de 50 a 300. Las muestras se prepararon al 0,1% en agua o acetato sódico 0,1M y fueron eluidas con ácido acético 0,1% o acetato amónico 0,1%, respectivamente. Los espectros de masas L-SIMS de baja resolución, en modo positivo, se realizaron en un espectrómetro MICROMASS AUTOSPEC. Como matriz se utilizó glicerina y como gas de bombardeo Cs ultrapuro. **Resonancia Magnética Nuclear:** Los espectros de RMN ¹H (300,14 MHz), H-H COSY, ¹³C (75,47 MHz) y Dept 135 se realizaron en un espectrómetro Bruker AMC300 en D₂O (SDS, >99,9%), a una temperatura constante de 25°C.

B) Síntesis de derivados

I. mono-6-O-tosil-b-ciclodextrina (b-CDTs). (i en esquema 1) Modificación del método de Matsui y Okimoto, 1978: Disolver b-ciclodextrina (29,65 g, 26,1 mmol) en piridina seca (300

mL), añadir gota a gota una disolución de TsCl (3,65 g, 19,1 mmol) en 30 mL de piridina seca. Agitar a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 12 horas. Evaporar a vacío a 60°C el disolvente hasta sequedad, lavar repetidas veces con éter dietílico y secar a vacío. Recristalizar 2-3 veces de agua a una temperatura superior a los 80°C. Secar a vacío, en presencia de P₂O₅, hasta peso constante. Por cromatografía de capa fina (eluyente A) se observan dos productos, uno mayoritario (95%) con un R_f de 0,55-0,56 (derivado monosililado) y otro minoritario (5%) con un R_f de 0,70 (derivado polisililado). Rendimiento 28%. p.f. 178-180°C (Desc.). ¹H RMN (D₂O) δ 7,75 (d, J= 8,1 Hz, 2H, H aromático), 7,43 (d, J= 8,1, 2H, H aromático), 4,9 - 5,15 (m, 7H, H-1), 4,39 (t, 1H, H-6'), 3,4 - 4,0 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3,36 (d, 1H, H-4'), 2,55 (s, 3H, CH₃); ¹³C RMN y DEPT 135 (DMSO-d₆) δ 144,77, 132,60 (C aromático sustituido), 127,54, 125,73 (C aromático), 102,17 (C-1), 81,44 (C-4'), 80,69 (C-4), 73,01 (C-3), 72,38 (C-2), 71,81 (C-5), 69,68 (C-6'), 68,85 (C-5'), 59,84 (C-6), 21,15 (CH₃). L-SIMS m/z 1189,29 (M⁺), Electrospray modo positivo m/z 1311,3 (M + Na).

II. mono-2-O-tosil-b-ciclodextrina (b-CD2Ts). (III en esquema 1) Modificación del método de Rong y D'Souza, 1990: Disolver b-ciclodextrina (2,87 g, 2,53 mmol) en DMF seca (40 mL). Añadir NaH (63,85 mg, 2,67 mmoles) y agitar durante la noche. Añadir, gota a gota, sobre una disolución de TsCl (0,48 g, 2,53 mmol en 5 mL de DMF seca). Agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Precipitar en 200 mL de acetona fría. Filtrar y lavar con acetona y secar a vacío hasta peso constante. Por cromatografía de capa fina (eluyente A) se observan tres manchas: dos intensas, correspondientes a la b-ciclodextrina (R_f 0,48) y al derivado monosililado (b-CD2Ts, R_f 0,55) y una tenue correspondiente al derivado polisililado. Electrospray: m/z 1157,2 (M + Na, b-ciclodextrina), 1311,3 (M + Na, b-CD2Ts). ¹³C RMN y DEPT 135 (D₂O) δ 145,07, 133,60 (C aromático sustituido), 129,50, 128,30 (C aromático), 104,20 (C-1), 101,50 (C-1'), 81,74 (C-4), 80,19 (C-2'), 73,21 (C-3), 72,8 (C-2), 72,11 (C-5), 69,85 (C-3'), 60,32 (C-6), 22,15 (CH₃).

III. mono-6-desoxi-6-amino-b-ciclodextrina (b-CDNH₂). (16) (II en esquema 1) Disolver 1-CDTs (1 g, 0,77 mmol) en 25 mL de amoníaco acuoso al 25%. Agitar durante 12 h a 50°C. Evaporar a vacío el disolvente hasta sequedad. Por cromatografía de capa fina (eluyente B) se observan tres productos: b-CD (R_f= 0,8), b-CDNH₂ (R_f= 0,48) y derivado polisililado (R_f= 0,28). Redisolver en agua destilada y ajustar el pH a 6-7. Purificar mediante cromatografía de intercambio iónico con una columna Sephadex C-25 (eluentes agua y 0,1 M NH₄HCO₃). Rendimiento: 45-50%. p.f. 202-203°C (desc.). ¹H NMR: δ 4,97 (s, 7H, H-1), 3,44 - 3,89 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3,36 (t, 1H, H-4'), 3,24 (dd, 1H, H-6'), 2,94 (dd, 1H, H-6'). RMN ¹³C y DEPT 135: δ 104,45 (C-1), 85,82 (C-4'), 83,89 (C-4), 75,71 (C-3), 74,43 (C-2), 74,37 (C-5), 62,93 (C-6), 42,82 (C-6'). Electrospray m/z 1134,4 (M⁺), 1156,3 (M + Na).

IV. *mono-3-desoxi-3-amino-b-ciclodextrina* (b-CD3NH₂). (IV en esquema 1) Disolver b-CD2Ts (1 g, 0,77 mmol) en 25 mL de amoníaco acuoso al 25%. Agitar durante 12 h a 50°C. Evaporar a vacío el disolvente hasta sequedad. Por cromatografía de capa fina se observan hasta productos (eluyente B): b-CD (Rf= 0,61), b-CD-3-NH₂ (Rf= 0,36), derivado polisustituido (Rf= 0,18) y derivado amino sustituido en posición 2, b-CD-2-NH₂ (Rf= 0,37). Redisolver en agua destilada y ajustar el pH a 6-7. Purificar mediante cromatografía de intercambio iónico con una columna Sephadex C-25 (eluentes agua y 0,1 M NH₄HCO₃). Rendimiento: 11,5% con respecto a la b-ciclodextrina. p.f. 203-205°C (desc.). ¹H NMR: δ 4,9 y 5,1 (dd, 7H, H-1), 4,14 (s, 1H, H-4'), 3,48 - 3,92 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 2,95 (d, 1H, H-3'). RMN ¹³C y DEPT 135: δ 106,15 (C-1'), 104,47, 104,37, 103,63 (C-1), 83,73, 83,61, 83,48 (C-4), 81,31 (C-4'), 75,77 (C-3), 75,67 (C-2), 74,68 (C-5), 62,92 (C-6), 54,78 (C-3'). Electrospray m/z 1134,3 (M⁺), 1156,3 (M + Na).

C) Estudios de complejación

La estequiometría de los complejos de inclusión formados se realizó mediante el *método de variaciones continuas*, *método de variaciones continuas* o *método de Job*, en el que se varían las concentraciones de ambas especies (huésped y ciclodextrina), manteniendo constante la concentración final (Connors, 1996). El método de Job es válido para cualquier técnica experimental en la que se mida una magnitud directamente proporcional a la concentración de complejo formado, y se basa en el hecho de que cualquier función que dependa directamente de la concentración de complejo (en nuestro caso el desplazamiento químico observado, Dd_{obs}) presenta un máximo respecto a la fracción molar de uno de los componentes de dicho complejo, con lo cual, de la posición de su máximo se pueden obtener los coeficientes estequiométricos n y m de la ecuación 1.



Ecuación 1

La determinación de la constante de equilibrio de los complejos de estequiometría 1:1 (K) y el desplazamiento químico máximo del complejo (Dd_{C11}) se realizó mediante un ajuste de los valores experimentales de Dd_{obs} de las muestras utilizadas para la determinación de la estequiometría a la ecuación 2, mediante el uso de un programa de ajuste no lineal de mínimos cuadrados.

$$\Delta\delta_{obs} = \frac{\Delta\delta_{C11}}{2[CD]_0} + \left\{ \frac{1}{K} + [CD]_0 + [H]_0 - \sqrt{\left(\frac{1}{K} + [CD]_0 + [H]_0 \right)^2 - 4([CD]_0[H]_0)} \right\}$$

Ecuación 2

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de estudiar la influencia de los factores electros-

táticos sobre la complejación de 2-naftalensulfonato, se decidió sintetizar dos monoamino derivados de la b-ciclodextrina, sustituidos por su cara primaria (posición 6) y secundaria (posición 3). En el esquema 1 se presenta la estrategia de síntesis seguida para llevar a cabo estas síntesis.

Inicialmente se sintetizaron los derivados intermedios tosilados en posiciones 6 y 2 (I y III, respectivamente), debido a que, al ser el grupo tosilo un buen grupo saliente, es reemplazado fácilmente por un nucleófilo, por lo que constituyen el primer paso para la síntesis de derivados más complejos de ciclodextrinas (Easton y Lincoln, 1999; Khan y col., 1998).

La síntesis del monoamino derivado en posición 6 (b-CDNH₂) se llevó a cabo a partir de una reacción de sustitución nucleófila, en la que el ion amonio desplaza al grupo tosilo en una disolución de amoníaco acuoso (II en esquema 1) (Ramos Cabrer y col., 1999).

La síntesis del monoamino derivado por la cara secundaria de la ciclodextrina (b-CD3NH₂) se llevó a cabo a partir del derivado b-CD2Ts, siguiendo la metodología propuesta por D'Souza y colaboradores (iv en esquema 1) (Khan y col., 1998). En esta reacción, el amoníaco actúa como base fuerte y como nucleófilo. Inicialmente, el derivado tosilado se transforma en el derivado mano-2,3-epoxi-b-ciclodextrina por la eliminación intramolecular del hidroxilo en posición 3. A continuación se produce una apertura de epóxido por un ataque nucleófilo del ion amonio para dar lugar como producto mayoritario el derivado b-CD3NH₂.

Una vez sintetizados los aminoderivados, se procedió a llevar a cabo los estudios de complejación del 2-NS, con ambos aminoderivados y la b-CD, mediante el estudio del desplazamiento de las señales de los protones y carbonos de la ciclodextrina y el 2-NS, las cuales se ven modificadas durante la formación del complejo debido a la modificación del entorno electrónico de los núcleos de ambas moléculas como consecuencia de la formación del complejo de inclusión (Connors, 1996; Connors, 1997).

Complejación del 2-NS por b-ciclodextrina

A pesar de que es preferible determinar la estequiometría y constante de equilibrio de los complejos formados a partir de los desplazamientos de los núcleos de ¹³C, debido a que estos son mayores que los observados para los núcleos de ¹H, en el presente trabajo se tuvo que estudiar los desplazamientos de los protones de ambas moléculas, ya que la modificación de la ciclodextrina ocasionó una pérdida de la simetría en su estructura, que produjo que las señales de ¹³C aparecieran como señales muy complejas, haciendo imposible su uso para el análisis.

En la figura 3 se presenta la gráfica de Job correspondiente a los protones H-1 de la ciclodextrina y el 2-NS para el complejo b-CD: 2-NS. Del análisis de esta gráfica se puede deducir que la estequiometría del complejo es 1:1, debido a que en ambos casos se observa el máximo a X_{CD} = 0,50 y X_{2-NS} = 0,50. También

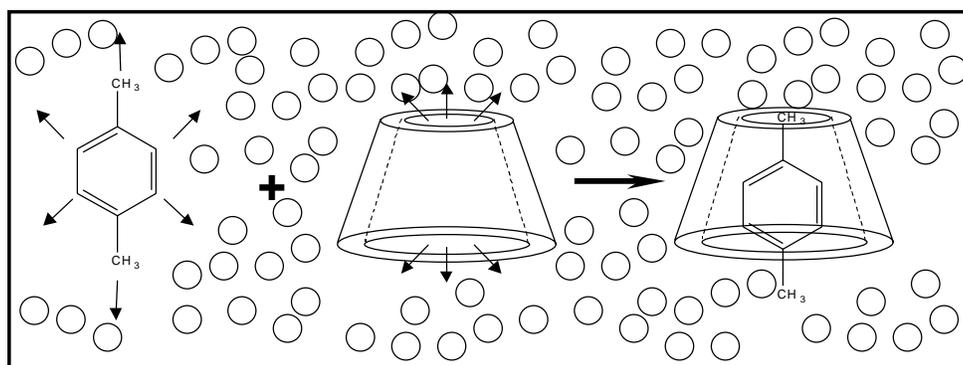


FIGURA 2. Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión entre una ciclodextrina y una molécula huésped.

es posible observar que el desplazamiento del protón de la ciclodextrina es mucho menor que el del protón del 2-NS, debido a que el H-1 de la ciclodextrina se encuentra orientado hacia el exterior de la ciclodextrina, con lo cual el efecto del huésped sobre él es menor.

Esta estequiometría concuerda con los resultados descritos por otros autores mediante el uso de otras técnicas experimentales como microcalorimetría (Nishijo y Ushiroda, 1998), espectroscopia (Hamai y Sakurai, 1998) y calorimetría (Inoue et al., 1993).

Una vez determinada la estequiometría y fortaleza del complejo formado, se procedió a establecer la estructura mediante el método propuesto por Inoue y colaboradores (Duchêne, 1991; Inoue y col., 1993) que establece que en el caso de complejación de moléculas aromáticas, los desplazamientos químicos son proporcionales a la variación del entorno electrónico del núcleo, con lo cual, a partir del análisis de los desplazamientos químicos de los protones H-3, H-5 y H-6 de la ciclodextrina (los que se ven más afectados durante la complejación al estar orientados hacia el interior de la cavidad) y los de la molécula huésped es posible determinar la estructura del complejo. Así, debido a que los desplazamientos de los carbonos C-6 y C-5 de la b-CD son mucho menores que los del C-3, es posible proponer que durante la formación del complejo el grupo sulfonilo queda orientado en la ciclodextrina hacia la parte de los hidroxilos secundarios, tal y como se muestra en la figura 4. Este resultado está en concordancia con la estructura propuesta por Nishijo y colaboradores determinada mediante un estudio de resonancia magnético nuclear ROESY (Nishijo y Ushiroda, 1998).

Complejación del 2-NS por b-CDNH₂

En la figura 5 se muestra la gráfica de Job para el complejo b-CDNH₂: 2-NS, obtenida a partir de los desplazamientos de los protones H-1 del 2-NS y del monoamino derivado. En esta gráfica es posible observar nuevamente que la estequiometría del complejo es 1:1, y que los desplazamientos de los protones de la ciclodextrina son menores que los del 2-NS.

Al analizar los valores de las constantes de equilibrio (ta-

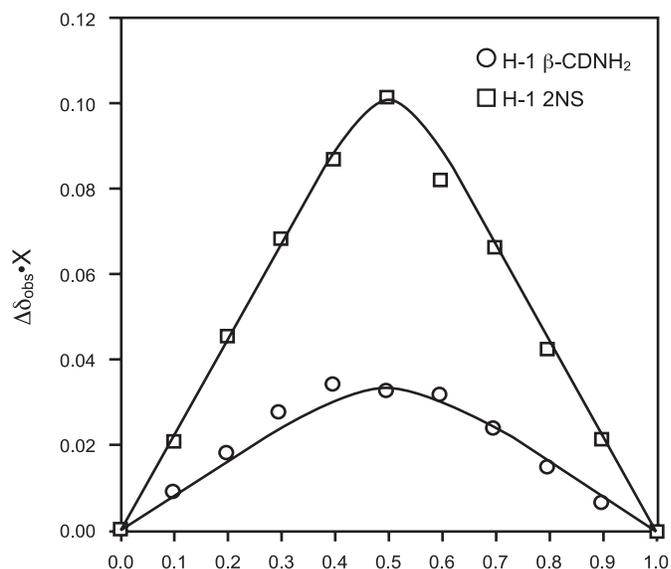


FIGURA 3. Gráfica de Job del complejo b-CD: 2-NS. Los puntos representan los valores experimentales. Las líneas corresponden a los ajustes no lineales por mínimos cuadrados para complejos 1:1

bla 1), es posible destacar en primer lugar que los valores determinados a partir de los valores de los desplazamientos del H-1 del aminoderivado presentan un error muy grande ya que al ser el desplazamiento máximo observado muy pequeño, la incertidumbre en la determinación de la constante se incrementa. Al comparar los valores obtenidos a partir del protón H-1 del 2-NS, resulta evidente que los valores de la

Receptor	H-1 Ciclodextrina K / 10 ³ M ⁻¹ Dd _{max} / ppm	H-1 2-Naftalensulfonato K / 10 ³ M ⁻¹ Dd _{max} / ppm
b-Ciclodextrina	K = 1.3 ± 0.4 Dd _{max} = 0.08 ± 0.003	K = 4.8 ± 1.0 Dd _{max} = 0.20 ± 0.003
b-CDNH ₂	K = 2.2 ± 1.9 Dd _{max} = 0.09 ± 0.006	K = 8.6 ± 3.2 Dd _{max} = 0.23 ± 0.003
b-CD3NH ₂	-	K = 0.9 ± 0.3 Dd _{max} = 0.05 ± 0.002

TABLA 1. Constantes de equilibrio (K) y desplazamiento máximo (Dd_{max}) para los complejos formados entre el 2-naftalen sulfonato con la b-ciclodextrina y los monoamino derivados.

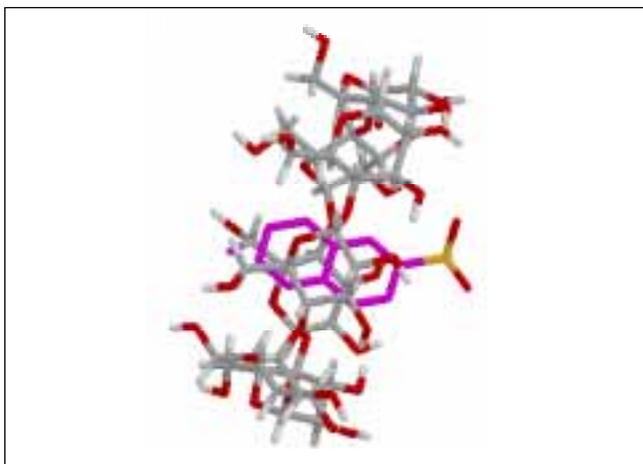


FIGURA 4. Representación esquemática del complejo: b-ciclodextrina: 2-naftalensulfonato. El color magenta representa el grupo naftaleno y el naranja el sulfonato.

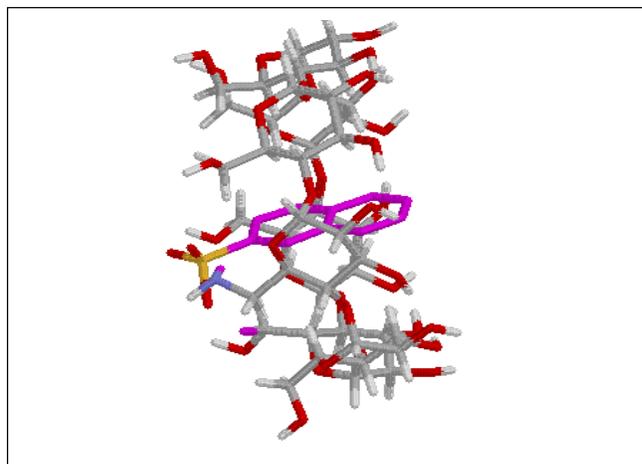


FIGURA 6. Representación esquemática del complejo b-CDNH₂: 2-naftalensulfonato. El color magenta representa el grupo naftaleno, el naranja el sulfonato y el azul el amino.

constante de equilibrio son prácticamente el doble que los obtenidos para la b-ciclodextrina. Este incremento en el valor de la constante de equilibrio concuerda con los resultados descritos en la bibliografía para los complejos formados entre el colato y el desoxicolato sódico con el amino (Ramos Cabrer y col., 1999) y etilendiamino (Singh y col., 1999) derivados, lo cual parece confirmar la influencia de la interacción electrostática entre el grupo amino y el grupo sulfonato.

Al analizar los desplazamientos de los carbonos C-3, C-5 y C-6 de la ciclodextrina, se observó un mayor desplazamiento del C-6 respecto al C-3, que se puede explicar considerando que, en este caso, el grupo sulfonato entra por la parte de los hidroxilos secundarios, desplazándose hacia la zona donde se encuentra el grupo amino (figura 6), con lo que la penetración del naftaleno en el interior de la cavidad de la ciclodextrina es mayor, lo que se ve reflejado en un incremento de la estabilidad del complejo.

Complejación del 2-NS por b-CD3NH₂

Debido a que durante la síntesis del monoamino derivado en posición 3 se produce una doble inversión de las configuraciones de los carbonos 2 y 3 de la glucosa sustituida, que se transforma en altrosa, que ocasiona se pierda la simetría de la molécula, al momento de realizar los espectros de RMN del sistema b-CD3NH₂: 2-NS, solamente fue posible determinar la estequiometría y constante de equilibrio a partir de los desplazamientos del protón H-1 del 2-NS. Al realizar la representación del gráfico de Job, se observó el máximo en $X_{2-NS} = 0.5$,

del que se deduce que nuevamente la estequiometría fue 1:1.

Al comparar el valor de las constantes de equilibrio de los complejos formados entre la b-ciclodextrina y el monoamino derivado en posición 6 con la constante de equilibrio del monoamino derivado en posición 3, se observa que este último valor es considerablemente menor. Asimismo, al comparar los desplazamientos máximos, se observa nuevamente que este último sistema presenta un valor muy pequeño, lo que parece indicar que la interacción del protón H-1 del 2-NS con la cavidad de la ciclodextrina es prácticamente nulo.

Estos resultados se pueden explicar si se considera que nuevamente existe una interacción electrostática entre el grupo amino de la ciclodextrina y el grupo sulfonato del 2-NS, que hace que el 2-NS se oriente con el grupo sulfonato próximo al grupo amino localizado en la cara secundaria de la ciclodextrina, con lo cual el grado de penetración del naftaleno en el interior de la cavidad es menor (la poca interacción del protón H-1, que se encuentra en la posición adyacente al grupo sulfonato, indica que se encuentra en el exterior de la ciclodextrina) y como consecuencia la fortaleza del complejo disminuye.

A partir de los resultados expuestos en el presente trabajo, es posible concluir que las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en la complejación de moléculas pequeñas. Así, en función de la posición del grupo iónico en la estructura de la ciclodextrina, estas interacciones electrostáticas pueden tener una influencia positiva (posición 6) o negativa (posición 3) sobre la fortaleza de los complejos de inclusión formados.

REFERENCIAS

- Álvarez-Parrilla, E., Al-Soufi, W., Ramos Cabrer, P., Novo, M., y Vázquez Tato, J. (2001). "Resolution of the association equilibria of 2-(p-toluidinyl)-naphthalene-6-sulfonate (TNS) with b-cyclodextrin and a charged derivative". *J. Phys. Chem. B* 105, 5994-6003.
- Brown, S. E.; Coates, J. H.; Easton, C. J. y Lincoln, S. F. (1994). "Metallocyclodextrins of 6A-(3-aminopropylamino)-6A-deoxy-b-cyclodextrin: Their formation and enantioselective complexation of (R)- and (S)-tryptophan anions in aqueous solution". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 90, 739-743.
- Brown, S. E.; Haskard, C. A.; Easton, C. J. y Lincoln, S. F. (1995). "Complexation of phenylalanine and histidine by b-cyclodextrin, 6A-(3-minopropylamino)-6A-deoxy-b-cyclodextrin and its metallocyclodextrins in aqueous solution". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 91, 1013-1018.
- Connors, K. A. (1996) "Measurement of cyclodextrin complex stability constants". En: Szejtli, J. y Osa, T. (eds.). *Cyclodextrins*, Oxford: Pergamon Press. Pp. 205-242.
- Connors, K. A. (1997). "The stability of cyclodextrin complexes in solution". *Chem. Rev.* 97, 1325-1357.
- Duchêne, D. (1991). *New trends in cyclodextrins and derivatives*. Paris, France.
- Easton, C. J. y Lincoln, S. F. (1999). *Modified cyclodextrins*. London: Imperial College Press.
- Fragoso, A.; Cao, R. y D'Souza, V. T. (1997). "Influence of positively-charged guests on the superoxide dismutase mimetic activity of copper (II) b cyclodextrin dithiocarbamates". *J. Carbohydr. Chem.* 16, 171-180.
- Hamai, S. y Sakurai, H. (1998). "²H₂O effects on the inclusion complexation of b-cyclodextrin with sodium 2-naphthalenesulfonate in capillary electrophoresis and UV spectrophotometry". *J. Chromatogr. A* 800, 327-332.
- Inoue, Y. (1993) *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* 27, 59-101.
- Inoue, Y.; Hakushi, T.; Liu, Y.; Tong, L.-H.; Shen, B.-J. y Jin, D. S. (1993). "Thermodynamics of molecular recognition by cyclodextrins. 1. Calorimetric titration of inclusion complexation of naphthalenesulfonates with a-, b- and g-cyclodextrins: enthalpy-entropy compensation". *J. Am. Chem. Soc.* 115, 475-481.
- Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J. y D'Souza, V. T. (1998). "Methods for selective modifications of cyclodextrins". *Chem. Rev.* 98, 1977-1996.
- Matsui, Y. y Okimoto, A. (1978). "The binding and catalytic properties of a positively charged cyclodextrin". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 51, 3030-3034.
- Nishijo, J. y Ushiroda, Y. (1998). "Interaction of 2-naphthalene-sulfonate with b-cyclodextrin: studies with calorimetry and proton magnetic resonance spectroscopy". *Chem. Pharm. Bull.* 46, 1790-1796.
- Petter, R. C.; Salek, J. S.; Sikorski, C. T.; Kumaravel, y Lin, F. (1990). "Cooperative binding by aggregated mono-6-(alkylamino)-b-cyclodextrins". *J. Am. Chem. Soc.* 112, 3860-3868.
- Ramos Cabrer, P.; Alvarez-Parrilla, E.; Meijide, F.; Seijas, V.; Rodríguez Núñez, E. y Vázquez Tato, J. (1999). "Complexation of sodium cholate and sodium deoxycholate by b-cyclodextrin and derivatives". *Langmuir* 17, 5489-5495.
- Rong, D. y D'Souza, V. T. (1990). "A convenient method for functionalization of the 2-position of cyclodextrins". *Tetrahedron Lett.* 31, 4275-4278.
- Saenger, W. (1980). "Cyclodextrin Inclusion Compounds in research and industry". *Angew. Chem. Int. Ed.* 19, 344-362.
- Sandow, M.; May, B. L.; Clements, P.; Easton, C. J. y Lincoln, S. F. (1999). "Complexes of 6A-(2-aminoethylamino)-6A-deoxy-b-cyclodextrin and 6A-[Bis(carboxylatomethyl)amino]-6A-deoxy-b-cyclodextrin with (R)- and (S)-tryptophanate and (R)- and (S)-phenylalaninate in aqueous solution. A pH titrimetric and N. M. R. spectroscopic study". *Aust. J. Chem.* 52, 1143-1150.
- Singh, A. P.; Ramos Cabrer, P.; Alvarez-Parrilla, E.; Meijide, F. y Vázquez Tato, J. (1999). "Complexation of 6-deoxy-6-(aminoethyl)amino-b-cyclodextrin with sodium cholate and sodium deoxycholate". *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 35, 335-348.
- Szejtli, J. (1988). *Cyclodextrin Technology*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Multiplicación *in vitro* del jengibre

Elda Fournier Sánchez* y Marlenis Cala Cala**

El jengibre representa un cultivo de gran importancia económica por sus múltiples usos. La finalidad de este trabajo es desarrollar una metodología que permita su propagación in vitro y recuperar la tradición agrícola en la provincia de Guantánamo, Cuba. El medio de cultivo basal fue el de Murashige y Skoog (1962) suplementado con varias concentraciones de BAP y Kinetina. El testigo (medio sin reguladores del crecimiento) resultó ser el más eficaz al obtener un coeficiente de multiplicación de 3.1 explantes. La edad óptima para los subcultivos estuvo entre 21 y 28 días posteriores a la siembra en el medio de multiplicación. Para el mejor desarrollo de explantes, la densidad adecuada fue de seis explantes por frasco. Como resultado final de este trabajo, se logró el objetivo propuesto que fue obtener la tecnología para la multiplicación in vitro de esta planta de difícil reproducción.

INTRODUCCIÓN

El jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) es uno de los cultivos más importantes de las especies de raíces de las plantas. Su importancia económica se debe a sus múltiples usos como especia, saborizante y por sus propiedades estimulantes o afrodisiacas y medicinales (Rodríguez, 1971).

En la actualidad se cultiva poco jengibre en Cuba, sin embargo, hace más de 50 años este producto se exportaba en cantidades apreciables. Específicamente en la región de Guantánamo este es un cultivo que se encuentra en el sector privado y aunque el 75% de estos suelos son montañosos, los municipios productores como El Salvador, Baracoa, Maisí, Imías y San Antonio del Sur, no producen cantidades suficientes para su consumo (Machuca, Leiva y García, 1998).

Para este trabajo se siguieron las diferentes etapas, según la experiencia en la propagación comercial, que define cinco etapas con sus objetivos específicos (Jiménez, 1997).

El desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* ha mostrado resultados ventajosos en la rápida propagación de diversas especies económicamente importantes. Estas técnicas como medio para la multiplicación clonal masiva de muchas plantas ha motivado gran interés en su aplicación en los últimos años, fundamentalmente en plantas con una producción pobre de propágulos, así como una propagación vegetativa insuficiente. Un método más eficiente y rápido de propagación y producción de planta es el cultivo de tejido *in vitro*.

Teniendo en cuenta que la forma de reproducción del jengibre conlleva a la transmisión de enfermedades, surge la necesidad de recuperar el cultivo para la introducción de la semilla básica de alta calidad genética y fitosanitaria en la producción

comercial y la posibilidad de un mayor aprovechamiento de los rizomas. Fue propósito de este trabajo establecer una metodología para la propagación *in vitro* a partir de yemas apicales y axilares para su rápida introducción en la producción como donante.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material utilizado fue a partir de explantes previamente establecidos que fueron tomados de yemas vegetativas brotadas de los fragmentos de rizomas sembrados en cantero en condiciones semicontroladas, los cuales permanecieron aproximadamente dos meses en el mismo. Tanto el sustrato como el material vegetal fueron previamente esterilizados.

Los instrumentos usados para la manipulación aséptica del material vegetal fueron esterilizados en estufa a 180°C durante dos horas antes de cada sección de trabajo y se mantuvo la asepsia, colocando este en solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% durante el trabajo, a partir de ahora se representará por (SHS).

El medio de cultivo basal utilizado contenía las sales inorgánicas y vitaminas propuestos por Murashige y Skoog (1962), que en lo sucesivo será definido como MS, suplementado con diferentes niveles de 6-BAP, Kinetina, AIA y AIB solos y combinados, con o sin reguladores del crecimiento en estado semisólido y líquido con soporte de papel de filtro. Para la gelificación de estos se utilizó agar (Sigma Chemical, Co.) a razón de 4.6 g.l⁻¹. En todos los casos el pH se ajustó a 5.8 antes del autoclaveado.

Todos los experimentos de la fase de multiplicación fueron incubados en cámaras de crecimiento de luz solar durante 42

* Facultad de Agronomía de Sabaneta, Guantánamo.

** Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Guantánamo, Cuba.

días a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) que osciló entre 25-43.75mm m⁻². S⁻¹ y 27 ± 2 °C de temperatura.

Todas las operaciones de siembra y transferencia del material vegetal en condiciones de esterilidad se realizaron en cabina de flujo laminar horizontal.

El procesamiento estadístico de los datos en las diferentes variables y fases experimentales consistió en un ANOVA de clasificación simple, previa comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad. Para detectar las diferencias significativas entre las medias a un nivel del 5% se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Para la aplicación de todos los métodos, procedimientos y pruebas de análisis, se utilizó el paquete estadístico computacional.

FASE DE MULTIPLICACIÓN

Es la de mayor importancia y complejidad en la micropropagación, pues en ella se determina la tasa de propagación que es la que define la etapa de eficiencia del proceso.

Efecto de 6-BAP y Kinetina en la multiplicación

Se procedió a estudiar la influencia de estas dos citoquininas solas, con el objetivo de determinar la influencia que tienen ambas por separado en el desarrollo de los explantes. Como testigo fue empleado el medio libre de reguladores del crecimiento y los tratamientos conformados para determinar el efecto de las citoquininas 6- BAP y Kinetina solas en los acápites de este punto. Se hicieron evaluaciones semanales en el periodo de 42 días para un total de seis, el tamaño de la muestra fue de 16 tubos por tratamiento. Como criterios de evaluación se tuvo en cuenta: el número de brotes por explantes.

El coeficiente de multiplicación se determinó dividiendo el número total de explantes obtenidos por frasco entre la cantidad explantada, al término de los 42 días de “sembrados”, se evaluó en tres subcultivos consecutivos y el tamaño de la muestra fue de 16 frascos por cada variante hormonal.

Determinación del tiempo óptimo para los subcultivos

El tiempo óptimo entre los subcultivos se estudió con el objetivo de determinar el efecto de éste en el incremento del número de brotes por explante. Las evaluaciones se realizaron en seis semanas consecutivas durante 42 días y estas constituyeron los tratamientos estudiados.

Influencia de la densidad de explantes por frasco en el número de brotes por explantes

Con el objetivo de determinar la densidad más adecuada para el óptimo desarrollo de los explantes se probó el comportamiento de 4, 5, 6, 7 y 8 explantes por frasco con 30 ml de medio MS sin reguladores del crecimiento vegetal. Los tratamientos fueron cinco y sólo se evaluó la cantidad de brotes por

explantes a los 30 días de implantados. El tamaño de la muestra fue de 20 frascos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de multiplicación

Efecto de 6- BAP y la Kinetina en la cantidad de brotes por explantes y en el coeficiente de multiplicación.

El tratamiento con los mayores valores en la cantidad de brotes por explantes en cada subcultivo fue el número 7, Tabla 1. Gulati y Jaiwal (1992), encontraron que en ocasiones aparecen múltiples brotes en ausencia de auxinas y de citoquininas.

Tratamientos		Cantidad de brotes/ explantes en cada subcultivo			
Número	Concentración (mg/L)				
	6-BAP	Kinetina	1er.	2do.	3er.
1	0.5	-	1.66 ab	2.66	3.53 ab
2	1.5	-	1.53 ab	3.46	3.0 ab
3	2.5	-	1.53 ab	2.96	3.86 a
4	-	0.5	1.6 ab	2.6	2.4 ab
5	-	1.5	1.4 b	2.46	3.06 ab
6	-	2.5	2.06 ab	3.13	2.2 b
7	-	-	2.8 a	3.53	2.93 ab
MG (±) ES			0.31	NS	0.76

Letras distintas difieren estadísticamente para p < 0.05

Autores como Babu, Samsudeen y Ratnambal (1992); Chang y Criley (1993); Babu y col. (1996) coinciden en que la regeneración de plantas aumenta considerablemente cuando los reguladores del crecimiento son eliminados completamente del medio. El mayor grado de multiplicación ocurrió en el medio sin reguladores del crecimiento con promedios de 2.8, 3.53 y 2.93, respectivamente, para un promedio general de 3.1 brotes por explantes. Esto coincide con lo planteado por Gulati y Jaiwal (1992), que en ocasiones la aparición de múltiples brotes se realiza sobre la base de una presencia auxínica nula o mínima y de la misma forma se comportan las citoquininas. Según Vázquez y Torres (1980); Hu y Wang (1983) existen especies que pueden ser establecidas sin citoquininas, al parecer porque hay suficiente cantidad endógena de este regulador del crecimiento en los explantes.

El coeficiente de multiplicación (Tabla 2) tuvo un comportamiento similar a la cantidad de brotes por explantes, coincidiendo el tratamiento 7 (Testigo) como mejor en el tercer subcultivo, para un promedio general de 3.1 brotes. Oliver (1996) a partir de un brote axilar obtuvo tres. Babu y col. (1996) coinciden en que la regeneración de plantas aumenta considerablemente cuando los reguladores del crecimiento son eliminados completamente del medio. En Costa Rica (Anónimo, 1998), se han obtenido resultados similares con diferentes niveles de 6-BAP y el control (sin reguladores).

Determinación del tiempo adecuado para los subcultivos

En la Figura 1 se observa que el ciclo de los subcultivos puede realizarse entre los 21 y 28 días después de efectuada la siembra, ya que a partir de este tiempo no hay diferencias entre los tratamientos, en cuanto a la cantidad de brotes por explantes, incluso en el segundo subcultivo aunque la estabilidad comienza a los 21 días, se observó que este no difirió estadísticamente del tratamiento 2. Resultados similares fueron obtenidos por Oliver (1996), el cual obtuvo la formación de brotes secundarios en la mayoría de los casos en un periodo de dos semanas, cada brote desarrolló por lo menos tres nuevos brotes y la capacidad de proliferación fue de cuatro semanas.

REFERENCIAS: PRIMER SUBCULTIVO, SEGUNDO SUBCULTIVO, TERCER SUBCULTIVO

Influencia de la densidad de explantes por frasco en el número de brotes por explantes

La densidad de explantes en la eficiencia de la multiplicación, arrojó diferencias significativas entre los tratamientos y la cantidad más adecuada para una mayor brotación fue de seis explantes por frascos (Figura 2.) En la literatura consultada no se encontraron referencias en cuanto a lo tratado en este punto.

CONCLUSIONES

1. Los mejores resultados en la cantidad de brotes por explantes y coeficiente de multiplicación se obtienen en el medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento, al plantar seis explantes por frasco de 250 cm³
2. El tiempo adecuado para los subcultivos estuvo entre los 21 y 28 días posteriores a la siembra.

TABLA 2. Influencia de 6-BAP y la Kinetina en el coeficiente de multiplicación

Tratamientos		Coeficiente de multiplicación por subcultivo			
Número	Concentración (mg/L)	1er.	2do.	3er.	
	6-BAP	Kinetina			
1	0.5	-	3.6	4a	0.94 c
2	1.5	-	4.06	3.75 a	1.33 c
3	2.5	-	3.8	4.13 a	1.50 bc
4	-	0.5	2.53	3.0 ab	1.81 bc
5	-	1.5	3.6	3.87 a	2.18 cb
6	-	2.5	3.73	2.0 b	2.87 ab
7	-	-	4.13	2.68 ab	3.68 a
MG (±) ES			NS	0.21	0.22

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para p < 0.05

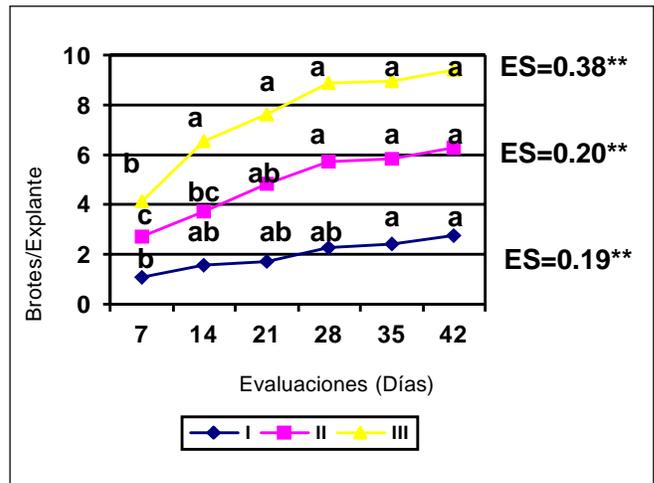


FIGURA 1. Tiempo adecuado para los subcultivos

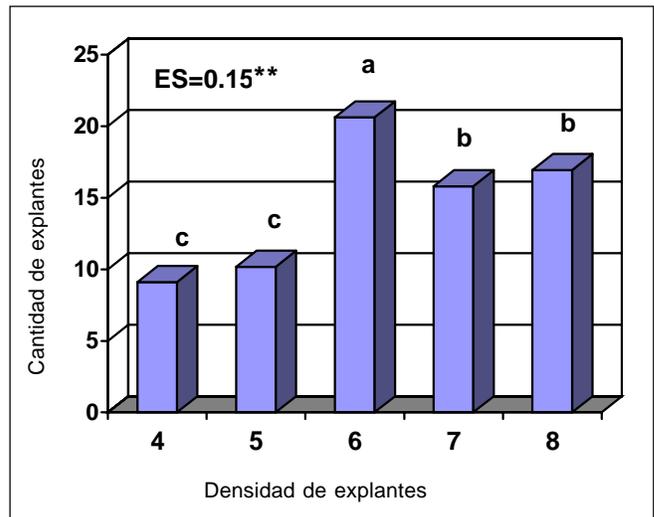


FIGURA 2. Densidad de explantes por frascos

REFERENCIAS

- Anónimo. (1998). Laboratorio de Biotecnología de Plantas. CIA. Universidad de Costa Rica.
- Babu, K. N; Samsudeen, K y col. (1996). "Embriogenesis and plant regeneration from ovary derived callus culture of ginger (*Zingiber officinale*, Roscoe)". *Journal of spices and aromatic crops*. 5(2), 134-138.
- Gulati, A. and Jaiwal, P. K. (1992). *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant cell tissue organ culture*. 29 (3), 195-205.
- Hu, C. V and J. P. Wang. (1983). "Meristem, shoot tip and bud culture". En: *Handbook of Plant Cell Culture*. V. 1. Evans, D. A; Ammirato, P. V y Yameda, Y. (eds). New York: MacMillan Publishing. Pp. 177-227.
- Jiménez, G. E. (1997). Curso teórico-técnico de propagación masiva de plantas. Santa Clara. Pp. 25-30.
- Machuca, Leiva y García (1998), Machuca, J. A., O. L. Reyes y L. G. Pérez. (1998). *La salud animal y el empleo de tecnologías apropiadas*. (Eds). Centro Universitario de Guantánamo. Pp. 204-254.
- Murashige y Skoog (1962), Murashige, T and Skoog. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". *Plant. Physiol.* 5, 473-497.
- Oliver, J. J. (1996). "The initiation and multiplication of ginger (*Zingiber officinale*, Roscoe) in tissue culture". *Journal article* No. 291, 10-11.
- Vázquez y Torres (1980) Vázquez, B. E. y Torres, S. (1980). *Fisiología Vegetal. Crecimiento y Desarrollo*. Ciudad de La Habana: Ed. Pueblo y Educación. Pp. 317- 362.

RESPUESTA DEL EMPLEO DEL BRASINOESTEROIDE

Biobras-16 en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) Var. "Campbell"

AVANCES DE INVESTIGACIÓN

Alberto Fernández Turro, Salvador Batista Mejías, Luis Gustavo Moisés Medina, Elda Fournier Sánchez* y C. F. Coll.**

*Este trabajo fue realizado en el huerto "El Resplandor", perteneciente a la Empresa de Cultivos Varios del Municipio Imías, provincia de Guantánamo, la misma está comprendida dentro del semidesierto cubano (franja costera sur), sobre un suelo areno-arcilloso. La investigación se llevó a cabo entre los meses de abril a junio de 2000; con el objetivo de determinar la dosis de aplicación más adecuada de brasinoesteroides (BIOBRAS-16), para lograr una estimulación más eficaz del rendimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) Var. Campbell 28. El producto bioactivo se asperjó de la forma siguiente: a los 27 días después del trasplante en horario de la mañana con los tratamientos de 1) control, 2) 25 mg/ha, 3) 40 mg/ha, y 4) 50 mg/ha, respectivamente. Las variables medidas fueron: diámetro del tallo, fecundación y rendimiento. Los resultados demostraron que el producto bioactivo fue efectivo en todos los tratamientos incluidos, siendo la dosis de 50 mg/ha la más efectiva, la cual arrojó diferencia significativa en el rendimiento en comparación con los restantes tratamientos, seguido por los tratamientos 3 y 2.*

INTRODUCCIÓN

El tomate constituye en Cuba la principal hortaliza tanto por el área que ocupa nacionalmente como por su producción. Este cultivo comprende el 50% del área total de hortalizas, es cultivado en todas las provincias del país, además es de gran importancia por su rico contenido en minerales y vitaminas, los cuales son elementos indispensables para una dieta humana balanceada.

En los últimos años, ha constituido una práctica la introducción de bioestimulantes para incrementar los indicadores de rendimiento y calidad en los cultivos de hortalizas, de los resultados obtenidos se han inferido los mecanismos de efectividad de estos productos sobre la calidad funcional de los mismos en los tejidos de las plantas, lo que ha contribuido a una mejor comprensión de sus potencialidades y a estimular a los productores e investigadores para el empleo frecuente de los mismos.

Entre las sustancias estimuladoras que se emplean en nuestro país se encuentran los brasinoesteroides, de ellos los conocidos comercialmente como BIOBRAS-6 y BIOBRAS-16. La utilización de estos en la agricultura moderna gana terreno de manera creciente, teniendo en cuenta sus características de hormonas antiestrés y su efecto intensificador del crecimiento,

desarrollo y fructificación, a partir de dosis muy reducidas que la hacen compatible con las tendencias actuales orientadas hacia formas sostenibles y ecológicas de la intensificación de la producción (Núñez, 1995). Esta autora (1996) destaca que el efecto de los brasinoesteroides en el crecimiento vegetal es particularmente fuerte en condiciones adversas de crecimiento (temperaturas subóptimas, salinidad) por lo que pueden ser llamados hormonas de antiestrés.

Teniendo en cuenta los efectos de estos bioestimulantes en la respuesta de las plantas en cuanto a acelerar la resistencia ante diferentes factores estresantes y a sus comprobados efectos sobre el incremento de los rendimientos agrícolas en el cultivo del tomate, desarrollamos el siguiente trabajo con el objetivo de determinar las dosis más efectivas del BIOBRAS-16, en las condiciones de un ambiente de baja pluviometría, altas temperaturas, y suelo areno-arcilloso.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue conducido sobre un diseño de bloques al azar, con cuatro réplicas e igual número de tratamientos, para un total de 16 parcelas, las cuales poseían un área de 18 metros cuadrados; y el área total fue de 0.02 ha con un marco de plantación de 0.25 x 0.80 m, para una densidad de 90 plan-

* Centro Universitario de Guantánamo, Facultad de Agronomía de Sabaneta.

** Laboratorio de Productos Naturales. Universidad de La Habana. MES. Dirección: Carretera de Guantánamo. Santiago de Cuba, km 2½ Guantánamo, Cuba. CP 95100. Teléfono: (53) (21) 325925, 324589, 326247.

tas por parcelas.

Para este experimento se utilizó la variedad de tomate Campbell 28. Las aplicaciones fueron efectuadas sobre el follaje en horario diurno mediante aspersión manual empleando para ello la mochila Matabí-16. Las dosis empleadas por tratamiento fueron a razón de: T1-testigo; T21-25 mg/ha; T3-40 mg/ha; T4-50 mg/ha.

Las variables medidas fueron: diámetro del tallo, fecundación, rendimiento. La primera medición en cada una de las variables se realizó el día antes de aplicar el producto; para el caso del diámetro las restantes dos mediciones se efectuaron con una frecuencia de 10 días. Para determinar la variable fecundación, se esperó que el cultivo alcanzara la floración masiva, identificando con hilo de nylon las inflorescencias, después de terminado el proceso de fructificación se contaron los frutos para calcular el por ciento de fecundación. Para analizar el comportamiento del rendimiento primeramente se determinó el rendimiento por plantas y finalmente el rendimiento t/ha.

El comportamiento de las precipitaciones y las temperaturas en el periodo del desarrollo de esta investigación, fue el siguiente:

Se registraron solamente 12 mm de precipitaciones; las temperaturas se mantuvieron elevadas con una media que osciló alrededor de los 30°C.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el tabulador electrónico Excel, comprobando las diferencias entre las muestras mediante la Prueba de Duncan para un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las tablas que se muestran en este trabajo, reflejan el comportamiento de las distintas variables (Diámetro del tallo, fecun-

Tratamientos	Medias (mm)		
	Mediciones		
	1	2	3
1	7.47	8.37	9.45
2	7.77	8.70	9.80
3	7.65	8.82	9.97
4	7.65	8.87	10.07

NS		
Es =0.24 CV =6.33%	Es =0.32 CV =7.39%	Es =0.17 CV =3.52%

No se encontraron diferencias significativas para el 0.05 %

dación, Rendimientos). Además un gráfico que muestra la correlación entre la fecundación y los rendimientos.

La Tabla 1 representa el comportamiento del diámetro del tallo en el cultivo del tomate cv Campbell 28 utilizada en la

experiencia, que a pesar de no existir diferencia significativa se observa un ligero incremento donde se ve favorecido el tratamiento 4, en el que se empleó una dosis de 50 mg/ha seguido de los tratamientos 3 y 2. Los incrementos para cada tratamiento respecto al testigo fueron: T2-0.35 mm, T3-0.52 mm, T4-0.62 mm. Es de vital importancia, que a pesar de no lograr una significación en los niveles de respuesta en cuanto al diámetro del tallo, todos los tratamientos bioestimulados con el BIOBRAS-16, manifestaron una respuesta positiva de incremento de esta variable en la medida que aumenta la dosis de aplicación. En otros estudios realizado por Núñez y col. (1996), demostró que al aplicar brasinoesteroides en dos condiciones diferentes en plantas de tomate, no hubo efectos

Tratamientos	Dosis MG/HA	MEDIAS (%)
1	Testigo	65.37
2	25	70.71
3	40	73.11
4	50	79.46
	Es =3.49	
	Cv =9.68 %	NS

significativos en el diámetro del tallo en las plantas tratadas con este compuesto y el control.

Cuando analizamos la respuesta de fecundación ante la aplicación de las diferentes dosis de BIOBRAS-16, manifiesta un comportamiento similar al observado en la Tabla 1, sobresaliendo el tratamiento 4 con incremento respecto al testigo de un 14.09%, seguido por el tratamiento 3 con 07.74% y 05.34 % para el tratamiento 2. Lo que infiere que en el proceso de fecundación a pesar de no existir una respuesta significativa al empleo de las diferentes dosis hormonales, responde de manera creciente en la medida que se incrementa la dosis de brasinoesteroides (Tabla 2). El comportamiento de la fecundación fue analizado como un posible indicador previo al rendimiento, sin embargo los resultados arrojaron discrepancias, pues hubo diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al rendimiento, pero la fecundación no se comportó de la misma forma, ya que no hubo diferencias entre ellos (Figura 1), lo que supone que durante el proceso de desarrollo del fruto hasta la maduración es donde el producto hormonal tiene una mayor influencia sobre el rendimiento.

La tabla 3 muestra el comportamiento de los rendimientos en el cultivo del tomate cv Campbell 28 con la aplicación de diferentes dosis de BIOBRAS-16 a los 27 días después del trasplante, donde se apreciaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. La aplicación de 50 mg/ha refleja los mejores resultados, diferenciándose significativamente del tratamiento 1 y 3, no así del tratamiento 2, alcanzando un incremento de 17.90 t/ha respecto al testigo, lo que demuestra la efectividad del producto sobre el incremento del rendimiento en el cultivo del tomate, independientemente de ser aplica-

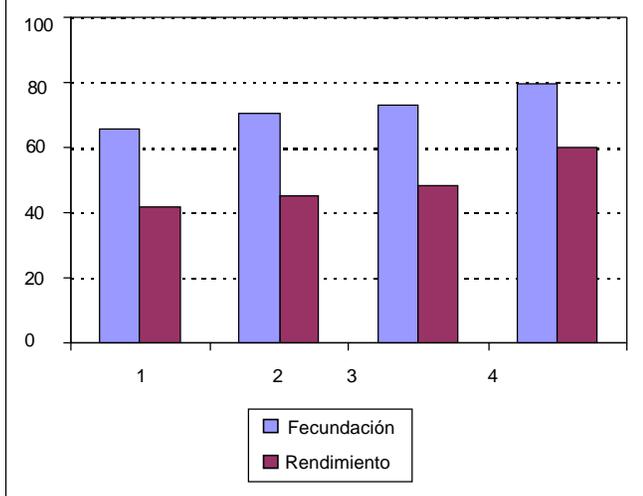
do a las plantas en etapas avanzadas de desarrollo. Resultados muy similares han corroborado la eficacia de los brasinoesteroides en el incremento de los rendimientos (Núñez y col., 1998), los que demostraron que la efectividad de este producto se incrementa cuando la dosis de 50 mg.ha⁻¹ se fracciona en dos aplicaciones, la primera efectuada siete días después del trasplante y la otra al inicio de la floración.

TABLA 3. Efecto del momento y dosis de aplicación de DAA-16 en los rendimientos del cultivo del tomate cv Campbell 28.

TRATAMIENTOS	DOSIS MG/HA	MEDIAS T/HA
1	Testigo	41.64 b
2	25	45.13 b
3	40	48.41 a,b
4	50	59.54a
		Es =3.65 Cv =15.017%

Letras diferentes indican diferencias significativas al 0.05 %

GRÁFICA 1. Comparación entre el proceso de fecundación y el rendimiento para los cuatro tratamientos



CONCLUSIONES

El producto conocido como BIOBRAS-16, análogo de los brasinoesteroides, es eficaz sobre el cultivo del tomate, fundamentalmente sobre el rendimiento.

No se observaron efectos significativos en cuanto al diámetro del tallo y la fecundación en las plantas tratadas con respecto al testigo.

El tratamiento más efectivo para las variables analizadas fue el 4 (50 mg/ha).

REFERENCIAS

- Alfonso, J. Núñez, M. (1996). "Biobras-16, nuevo modo de aplicación en hortalizas". In: Seminario Científico, 10. La Habana. Programa y Resúmenes. La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. P.159.
- Coll, D. y col. (1998). "Influencia del análogo Brasinosteroide BB-16 en Papa y Hortalizas, bajo diferentes condiciones edafoclimáticas". XII Forum Nacional de Ciencia y Técnica. Ciudad de La Habana, Cuba.
- Fernández, A. y col. (1997). "Efecto de análogos de brasinoesteroides en cultivos hortícolas". In: Producción de cultivos en condiciones tropicales. La Habana. Resúmenes. La Habana, Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". Pp.36-37.
- Núñez, M. (1999). "Aplicaciones prácticas de los brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura". Reseña bibliográfica. *Cultivos Tropicales*, v.20, 63-72.
- Núñez, Míriam; J. P. Domingo; W. Torres; F. Coll; Eshter Alonso y Bacupunturabara Benítez. (1995) (1). "Influencia de los análogos de brasinoesteroides Biobras-6 en el rendimiento de plantas de tomate cultivar INCA-17". *Cultivos Tropicales* 16(3), 49-52.
- Núñez, M. (2000). "Análogos de brasinoesteroides cubanos como biorreguladores en la agricultura: Informe final del Proyecto de Investigaciones". La Habana: PNCT Biotecnología Agrícola / CITMA.
- Rosales, A. L., Jomarrón, I. (1995). "Efecto de la aplicación de biorreguladores en el cultivo del tomate". In: Taller de productos bioactivos, 1., e Taller de brasinoesteroides, 4. La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Las cactáceas de Samalayuca

Irma Delia Enríquez Anchondo*

Los Médanos de Samalayuca se encuentran ubicados dentro de una cuenca endorreica en la región conocida como Desierto Chihuahuense. Se localiza en la porción norte del estado de Chihuahua. El área corresponde a una de las regiones más áridas de la entidad, ubicada dentro de la provincia biótica llamada "Llanuras y médanos del norte" y clasificada por la CONABIO en 1999 como área prioritaria para la conservación. El clima es muy seco, templado con verano cálido BWk, con temperatura media anual de 15 a 25°C y precipitación pluvial promedio de 212 mm al año. La altitud es de 1,250 en las partes planas y cuencas y hasta de 1,820 metros sobre el nivel del mar en las partes más altas de las sierras. Presenta formación de dunas tipo Akle, de origen eólico. El área con vegetación que rodea a las dunas se compone de sedimentos no consolidados de origen aluvial depositados durante el periodo Cuaternario y consisten de capas de grava, arena y arcilla. Las dunas se cree fueron depositadas por el ancestro del Río Bravo durante el Pleistoceno y están constituidas de sílica con una pureza estimada de 94%. Se determinaron cuatro tipos de vegetación, con una lista florística de aproximadamente 200 especies, y una diversidad de cactáceas de 16 especies contenidas en cinco géneros, tres tribus e igual número de subfamilias, siendo la subfamilia más abundante la Cactoideae. La familia presenta especies contenidas en la NOM-059 ECOL-1994.

INTRODUCCIÓN

Las cactáceas son las plantas que más han fascinado a la humanidad por su singularidad y métodos de sobrevivencia, son nativas del Continente Americano, que es donde tienen la mayor presencia, pero se encuentran actualmente en todo el mundo (Arias, 1993).

Se relacionan con los desiertos que es el hábitat que presenta más individuos de esta familia y es aquí donde han sufrido a lo largo del tiempo procesos extraordinarios de adaptación y supervivencia (Enríquez y Olivas, 1999).

El nombre cactácea proviene del griego *kaktos*, que significa cardo, Linneo introdujo las cactáceas a la ciencia con el nombre de *cactus*, Colón las llevó de las Antillas a España y las presentó ante los Reyes católicos entre su muestrario de hombres, animales y plantas. Causaron gran sensación y pronto fueron cultivadas e introducidas a toda la Cuenca del Mediterráneo (Bravo, 1997).

Se ubican taxonómicamente dentro de la clase de las dicotiledóneas, como plantas suculentas generalmente xerófitas, con tejidos de almacenamiento muy desarrollados para conservar agua y nutrientes y poder sobrevivir largos periodos de sequía (Rodríguez y Porras, 1985).

Su método de reproducción es vegetativa, pero algunos se reproducen por semilla, crecen erectos, otros a ras de suelo con flores hermafroditas, vistosas, las nocturnas son blancas con tonos amarillos o rojizos, las diurnas son blancas, púrpura, amarillas, anaranjadas y verdes (Arreola, 1997).

Los cactus son plantas que tienen numerosas espinas y tallos suculentos o jugosos, pero la característica principal para ser denominado cactus, es la presencia de areolas en los tallos (Bravo, 1997).

La areola es una estructura de aspecto algodonoso que se presenta sobre el cuerpo de la planta y de ahí crecen fibras lanosas, cerdas, espinas, flores y frutos (Bach's Cactus nursery, 1976).

Son perennes, con duración de más de 2 años a tiempo indefinido, algunas llegan a vivir más de 150 años (Arreola, 1997).

En el caso de la cholla *Opuntia imbricata*. La mayoría de las plantas alcanzan su máximo tamaño en 40 años aproximadamente. El periodo de mayor crecimiento ocurre en julio, que coincide con el periodo de floración (Pieper y Fraser, 1974).

Muchas de ellas exhiben pigmentación grisáceoverdosa o verde opaco como una adaptación a las condiciones rigurosas de la vida desértica (Kliem, 2000).

Las cactáceas son plantas con habilidad natural para almacenar agua en su cuerpo y raíces (Bach's cactus Nursery, 1976), poseen una extensa red de raíces que crecen muy cerca de la superficie, para poder absorber en el menor tiempo posible la mayor cantidad de agua de las escasas lluvias.

Gibson y Nobel (citados por Bravo, 1997), consideran que las cactáceas son un grupo natural que evolucionó en los últimos 80 millones de años, a partir de plantas no suculentas, con hojas bien desarrolladas, con fotosíntesis del tipo C_3 , y formación de dunas tipo Akle y una diversidad animal y vegetal interesantes. Según Johnston (1977), en el Desierto de Chihuahua hay al menos 1,000 especies endémicas, en México crecen

* Departamento Pecuario, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Biomédicas de la UACJ.

cerca del 85% de estas especies donde destacan los géneros *Mammillaria* y *Opuntias* (Sociedad Mexicana de Cactología, 2001).

Por estos motivos, los objetivos principales del estudio de las cactáceas en Samalayuca son:

- Hacer un inventario lo más preciso posible de los géneros y especies del área.
- Propiciar futuras investigaciones en esta familia de plantas.
- Contribuir al listado florístico del estado de Chihuahua.
- Llamar la atención de las autoridades gubernamentales y de centros de investigación para que se considere a esta región como un área natural protegida.
- Servir de información a estudiantes y a la población en general para que conozca los recursos naturales que nos brinda el desierto, así como los beneficios y utilidades que de ellos se derivan.

Materiales y métodos

1. Material cartográfico: Cartas topográficas: INEGI. Esc.1:50,000, H13A35, H13A45, H13A36, H13A46. Esc.1:250,000 H13 - I. Mapa de tipos de vegetación y sitios de productividad forrajera del estado de Chihuahua elaborado por la Cotecoca – SARH. 1978. Carta de climas de INEGI 138 - I.
2. Registros climáticos.
3. Literatura especializada en taxonomía, vegetación, floras, etc. para identificación de especies e información complementaria del listado.
4. Estereoscopio.
5. Colaboración con los Herbarios de la UACJ, UNAM y UTEP para corroboración de ejemplares.
6. Ejemplares botánicos colectados por la autora y colaboradores.
7. Listados de especies de otras dependencias e instituciones educativas.
8. Planímetro.
9. Imágenes de satélite. INEGI.
10. Formas de muestreo y toma de datos de campo.
11. Vehículo de la UACJ.
12. Manuales de identificación de plantas.
13. Prensa de madera.
14. Cartón, papel secante, papel periódico, pincelín.
15. Hacha, tijeras, pala.
16. Bolsas de papel.
17. Bolsas de plástico.
18. Libreta de apuntes.
19. Caja de cartón.
20. GPS geoposicionador.
21. Cartas topográficas.
22. Lupa.
23. Cámara digital.
24. Formatos de muestreo.

Metodología

El trabajo se inició en 1997 y se concluyó en 1998, las colectas de ejemplares en el campo, así como la determinación de los tipos de vegetación y medición de sus características, se llevaron a cabo en dos temporadas: de agosto a octubre y en primavera durante los meses de marzo a mayo. Se hicieron además otras salidas de campo fuera de estas temporadas en las que también se colectaron ejemplares que se encontraban disponibles.

La delimitación del área de estudio se realizó basándose en criterios fisiográficos, siguiendo parámetros de cuenca hidrológica, de formación de dunas, de homogeneidad en la fisonomía de la vegetación, consultando fuentes bibliográficas anteriores, así como tomando en cuenta el objetivo del estudio por parte del Gobierno del Estado.

Primero se delimitó la zona en cartas topográficas esc. 1:50,000 donde se mapeó la vegetación mediante recorridos por toda el área, anotando en cada tipo de vegetación: especies dominantes, especies asociadas, topografía, tipo de suelo, grado de erosión o utilización, abundancia de especies, cobertura vegetal, mediante muestreos de transecto a pasos (100 puntos), esto con el fin de determinar el estado o condición actual del ecosistema.

Las colectas de plantas se hicieron en toda el área, y programándolas de acuerdo a la observación en campo sobre diversidad de especies, tomando en cuenta diferencias en tipos de vegetación, exposición solar, topografía, dirección de vientos, posibles áreas reliquia, etc.

Mientras fue posible, se colectaron cinco ejemplares de cada planta para incrementar el acervo y capacidad de intercambio del herbario de la UACJ donde se encuentran los ejemplares colectados, así como en el Herbario de la UTEP, ya que el Dr. Richard Worthington, curador de dicho herbario participó en el proyecto dentro del área taxonómica para identificación de las especies.

Algunos de los ejemplares colectados se encuentran como material vivo en el Jardín Botánico del Instituto de Ciencias Biomédicas de la UACJ, instalado en el edificio de Investigación y Posgrado de dicho Instituto.

A la fecha existen algunos ejemplares en identificación en los Herbarios de la UNAM y UTEP, por lo que el listado final deberá seguir incrementándose mediante otras investigaciones posteriores.

DISTRIBUCIÓN DE LAS CACTÁCEAS EN LOS TIPOS DE VEGETACIÓN DE LOS MÉDANOS DE SAMALAYUCA

La zona árida donde se ubica la región de Samalayuca se caracteriza por sus condiciones extremas, como baja precipitación pluvial y mala distribución, menor de 300 mm al año, las lluvias se presentan en forma torrencial; tolera largos periodos de sequía donde las temperaturas medias al año en promedio son de 15 a 25°C, siendo muy altas en primavera y verano (ma-

vores a 40°C) y muy bajas en invierno (bajo cero); presencia de no menos de siete meses secos; insolación y evaporación alta con poca humedad ambiental, heladas intensas y nevadas y con una cubierta vegetal menor del 70% con dominancia principalmente de especies xerófitas (Cotecoca, 1994).

La distribución de la vegetación está condicionada al factor climático principalmente, aunque existen comunidades vegetales formadas a partir de las condiciones edafológicas, geológicas y topográficas (INEGI, 1998).

De acuerdo con la clasificación de COTECOCA (1978), en la región de los Médanos de Samalayuca se presentan comunidades vegetales:

I. De origen climático:

a) El matorral inerme parvifolio en planos y laderas que bordean las sierras Presidio y Samalayuca, cuya especie dominante es la gobernadora *Larrea tridentata*, asociada con el hojaseñ *Flourensia cernua* y la mariola *Parthenium incanum*.

Las especies de cactáceas que se localizaron en este tipo de vegetación son: biznagueta *Coryphantha sneedii*, pitaya *Echinocereus dasyacanthus* y *E. triglochidiatus*, biznaga *Mammillaria grahamii*, nopal de las dunas *Opuntia arenaria*, nopal *O. engelmannii*, *O. violacea* var. *macrocentra*.

b) El matorral mediano subinerme se distribuye sobre las llanuras onduladas limítrofes con el matorral de gobernadora y el matorral de médanos, formando una zona de transición vegetal importante para el refugio y reproducción de la fauna silvestre.

Este tipo de vegetación tiene como especies arbustivas dominantes a la gobernadora *Larrea tridentata* y al mezquite *Prosopis juliflora* var. *glandulosa* además de otras de menor abundancia como son el chamizo *Atriplex canescens*, ocotillo *Fouquieria splendens*, hojaseñ *Flourensia cernua* y palma *Yucca elata* y *Y. torreyi*, que le dan la apariencia clásica del desierto.

Se encontraron las cactáceas: nopal de dunas *Opuntia arenaria*, nopal *O. engelmannii*, *O. violacea* var. *macrocentra*, tasajillo *O. leptocaulis* y cholla *O. imbricata*.

c) Pastizal amacollado abierto localizado en las serranías de Presidio y Samalayuca, donde difiere en especies vegetales debido a la exposición solar e intensidad del golpe de los vientos que en esta región siguen una dirección NW y SE, siendo sus principales elementos vegetales los pastos amacollados del género *Bouteloua*, cuyas especies dominantes son: banderilla *Bouteloua curtipendula*, navajita roja *B. trifida*, navajita negra *B. eriopoda*. Encontramos como componentes secundarios y de poca abundancia las especies arbustivas: mariola *Parthenium incanum*, ocotillo *Fouquieria splendens* y palmilla *Nolina texana*; y es en estas zonas donde se concentran la mayoría de las especies de cactáceas de la región,

debido a las condiciones edafológicas y de topografía ideales para el hábitat de estas plantas.

Se encontraron las siguientes especies de cactáceas: biznagueta *Coryphantha sneedii*, *C. strobiliformis*, barrilito *Echinocactus parryi*, *E. horizonthalonius*, pitayas *Echinocereus dasyacanthus*, *E. enneacanthus*, *E. triglochidiatus*, *E. chloranthus*, *E. coccineus*, *E. pectinatus*, biznaga *Mammillaria grahamii*, nopal de dunas *Opuntia arenaria*, nopales *O. violacea* var. *macrocentra*, *O. engelmannii*, *O. leptocaulis*.

II. De origen edáfico

a) Se desarrolla el matorral de médanos que comprende la mayor parte de la superficie y que se encuentra rodeando el cuerpo de dunas móviles sin vegetación. Este tipo de comunidad vegetal se caracteriza por la presencia de especies arbustivas principalmente el mezquite *Prosopis juliflora* var. *glandulosa*, chamizo *Atriplex canescens*, hierba de la menta *Poliomintha incana* y estafiate *Artemisia filifolia*.

Morton y Hull (1973), consideran a la *Artemisia* como el arbusto más ampliamente distribuido en los desiertos fríos.

Las especies de cactáceas que aquí crecen son: biznagueta *Mammillaria grahamii*, nopal *Opuntia engelmannii*, *O. violacea* var. *macrocentra*, y tasajillo *Opuntia leptocaulis*.

Por último, ocupando una extensión de aproximadamente 10,000 hectáreas y localizados justo a los pies de la sierra Presidio, se encuentran los Médanos de Samalayuca, formados por dunas móviles de escasa a nula vegetación, cuya formación es de tipo Akle, y con una composición química de la arena del 94% de sílica (MacDougal citado por Lesueur, 1945).

La altura desde el ápice hasta el fondo del lecho marino es por lo general de 15 metros, pero en el área oeste de la Sierra Presidio donde la arena está en constante movimiento por la dirección prevaleciente de los vientos del este, existe una serie de dunas que alcanzan alturas de 60 metros o más (Lesueur, 1945).

ESTATUS DE LAS CACTÁCEAS DE SAMALAYUCA

En México se encuentra el mayor número de especies endémicas, es decir cerca del 85% de las especies mexicanas crecen solamente en este país (Sociedad Mexicana de Cactología, Cons. Elect., 2001) y por lo atractivo y caprichoso de sus formas y estructuras este tipo de plantas han sido objeto de una irracional extracción, ya sea para utilizarse para ornato, o para venta, reproducción, estudio, etc., pero esto ha ocasionado una disminución en las poblaciones normales, y en la actualidad algunas de ellas se encuentran contenidas en la NOM-059- ECOL-2000, emitida por la Semarnap. Esta Norma Oficial Mexicana, determina las especies de flora y fauna silvestre terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras, y las sujetas a protección especial (Semarnap, 2000).

Plantas que se encuentran dentro de la NOM-059-ECOL-2000:	
PLANTA	ESTATUS
<i>Echinocactus parry</i>	amenazada
<i>Opuntia arenaria</i>	sujeta a protección especial
Estatus de plantas en Nuevo México, Estados Unidos (publicación electrónica 2001).	
<i>Coryphantha sneedii</i> var. <i>sneedii</i>	rara
<i>Coryphantha strobiliformis</i>	rara
<i>Opuntia arenaria</i>	rara
Estatus de plantas en Texas, (Jones y col. 1997).	
<i>Coryphantha sneedii</i>	TOES I
<i>Opuntia arenaria</i>	TOES V
<i>Opuntia engelmannii</i>	TOES IV
SIGNIFICADO DE LA SIMBOLOGÍA:	
TOES: Texas Organization for Endangered Species	
TOES, 1993 Categoría:	
TOES I. En peligro de extinción. Legalmente protegidas.	
TOES II. Amenazada. Legalmente protegidas.	
TOES III. En peligro de extinción pero sin protección legal.	
TOES IV. Amenazada, sin protección legal.	
TOES V. Rara, de baja población, sin protección legal.	

Relación taxonómica de las cactáceas en Samalayuca		
<i>Familia Cactaceae</i>		
Subfamilias		
Opuntioideae	Pereskioideae	Cactoideae
Género		9 tribus (2)*
Opuntia		Echinocereae Cacteeae
Tribus		
Opuntioideae	Echinocereae	Cacteeae
Géneros		
Opuntia Leptocaulis	Echinocereus dasyacanthus	Echinocactus parry
O. arenaria	E. chloranthus	E. horizonthalonius
O. violacea		
var. macrocenthra	E. coccineus	C. sneedii
O. imbricata	E. triglochidiatus	C. strobiliformis
O. engelmannii	E. enneacanthus	Mammillaria grahamii
	E. pectinatus	

* De las 9 tribus, sólo dos están representadas en el área.
Guzmán, 1997.

Distribución de las cactáceas de Samalayuca en tipos de vegetación					
Nombre común	Nombre científico		Tipo de vegetación		
		Mat. In.	Mat. med. sub.	Mat. med.	Past. amac
Nopal	<i>Opuntia engelmannii</i>	X	X	X	X
Cholla	<i>Opuntia imbricata</i>				X
Nopal de dunas	<i>Opuntia arenaria</i>	X	X	X	
Tasajillo	<i>Opuntia leptocaulis</i>	X	X	X	X
Nopal	<i>Echinocactus parry</i>				X
Barrilito	<i>Echinocactus horizonthalonius</i>				X
Pitahaya	<i>Echinocereus dasyacanthus</i>	X			X
Pitaya	<i>Echinocereus enneacanthus</i>			X	
Pitaya	<i>Echinocereus triglochidiatus</i>	X			X
Pitaya	<i>Echinocereus coccineus</i>			X	
Pitaya	<i>Echinocereus pectinatus</i>				X
Pitaya	<i>Echinocereus chloranthus</i>				X
Biznagueta	<i>Mammillaria grahamii</i>	X		X	X
Biznaga	<i>Coryphantha sneedii</i>	X			X
Biznaga	<i>Coryphantha strobiliformis</i>				X

SIMBOLOGÍA: **Mat. In.-** Matorral inerme parvifolio. **Mat. Med.sub.-** Matorral mediano subinerme.
Mat. Med.- Matorral de médanos. **Past. Amac.-** Pastizal amacollado abierto. Barraza y col., 1997

SINONIMIA (Jones y col., 1997)

a) *Echinocactus horizonthalonius* C. Lemaire var. *horizonthalonius*

Syn: *E. horizonthalonius* var. *moelleri*. F.A. Haage.

b) *Echinocereus chloranthus* (Engelm) F.A. Haage var. *chloranthus*

Syn: *Cereus chloranthus* Engelm.

c) *Echinocereus coccineus* Engelm. Var. *coccineus*

Syn: *Cereus conoidens* Engelm & J. Bigelow

Syn: *E. coccineus* (Engelm) Engelm var. *melanacanthus* Engelm.

Syn: *E. coccineus* var. *cylindricus* Engelm.

Syn: *Mammillaria aggregata* Engelm.

d) *Echinocereus dasyacanthus* Engelm

Syn: *E. pectinatus* (M. Scheidweiler) Engelm var. *dasyacan-*

thus (Engelm)N.Taylor

Syn: *E. pectinatus* var. *neomexicana* (J. Coulter) L.Benson.

e) *Echinocereus enneacanthus* Engelm var. *enneacanthus*

Syn: *E. enneacanthus* Engelm var. *brevispinus* (W. Moore) L. Benson.

f) *Opuntia engelmannii* J. Salm –Reiff – Dick var. *engelmannii*

Syn: *O. dillei* D. Griffiths

Syn: *O. phaeacantha* Engelm var. *discata* (D.Griffiths) L.

Benson & D. Walkington.

g) *Opuntia macrocentra* Engelm var. *macrocentra*

syn: *O. violacea* Engelm var. *castetteri* L. Benson

Syn: *O. violacea* var. *macrocentra* (Engelm) L.Benson

Syn: *O. violacea* Engelm var. *violacea*

h) *Mammillaria grahamii* Engelm var. *grahamii*

Syn: *M. microcarpa* Engelm

Syn: *M. microcarpa* var. *auricarpa* W.Marshall

Syn: *M. milleri* (N. Britton & J. Rose) F. Bodecker

DESCRIPCIÓN DE LAS CACTÁCEAS DE SAMALAYUCA

Echinocactus parry Engelm. Barrilito.

Reg. UACJ.1009.

Misma descripción del *Echinocactus horizonthalonius*.

Echinocactus horizonthalonius. C. Lemaire. Barrilito.

Reg. UACJ. JB44

Plantas simples, globosas, color verde glauco o grisáceo, de 4 a 25 cm de altura; costillas 8 a 13, obtusas a veces espiraladas, áreolas distantes entre sí de 1 a 2 cm; espinas 6 a 9 rectas, encorvadas o aplanadas. Espina central más gruesa que las radiales. Las flores nacen en el ápice, de color rosa, fruto dehiscente de 3 cm, color rojo, semillas de 2 mm de longitud color casi negro.

Esta especie se confunde a menudo con *E. parry*.

Echinocereus triglochidiatus Engelm. Pitaya.

Reg. UACJ. 915

Es uno de los cactus llamados pitayas más atractivos, crece en las laderas rocosas y gravosas del pastizal amacollado de las sierras Presidio y Samalayuca, aunque también es común encontrarlo en el matorral inerme de gobernadora que está adyacente a este pastizal.

Es de tamaño grande, sus tallos crecen más de 30 cm de largo por 7.5 de ancho, las espinas 3 a 4 de 2.5 cm de largo, de sección triangular. Florece de abril a junio y sus flores de color rojo duran abiertas de 2 a 3 días, los frutos son comestibles.

Echinocereus pectinatus (Scheidw) Engelm. Pitaya.

Reg. UACJ. JB48

Pectina= aplanada y extendida.

Endémica. Presenta espinas radiales 22 a 30, no entrelazadas, pectinas, flores de color rojo violáceo. El tallo ovalado-cilíndrico ramifica a partir de la base de 15 a 20 cm de alto. Aproximadamente 20 costillas. Areolas afieltradas, espinosas, muy juntas y

ovales. Espinas centrales en número de seis o más.

Echinocereus enneacanthus Engelm. Pitaya. Cactus fresa.

Reg. UACJ. 914.

ennéa = nueve, ácantha = espina

De lento crecimiento, tallo inicial con ramificaciones basales, forma grupos de hasta 20 cm de longitud y diámetro de 5 – 7 cm; 7 a 20 costillas con areolas blancas redondas distanciadas 2 cm entre sí. Espinas radiales en número de 8, desiguales, robustas en la base de 1 cm de longitud amarillentas e irradiadas, y una única espina central. Flor roja a magenta. Fruto esférico, rojo, jugoso y comestible.

Echinocereus chloranthus Engelm. Pitaya.

Reg. UACJ.JB33.

Crecen en grupos. De 20 cm de altura por 5 a 7.5 cm de ancho, espinas radiales 3 a 6, la flor es variable en color verdosa a café rojiza y aparecen en cualquier lado del tallo, sin esencia y dura sólo unos cuantos días, florea de abril a mayo.

Echinocereus dasyacanthus Engelm. Pitaya.

Reg. UACJ.913.

Plantas simples, muy espinosas de 10 a 30 cm de altura, por 5 a 9 cm de ancho, costillas 15 a 21, rectas espinas radiales 16 a 24, de 1.5 cm de longitud, flores nacen cerca del ápice, color amarillo canario y rojizas a la madurez, fruto comestible, poco agrio.

Echinocereus coccineus Engelm. Pitaya.

Reg. UACJ. JB34.

Plantas simples o cespitosas, globosas, muy espinosas: espina radial con la punta café, erectas, más o menos en número de 20, flor muy grande color púrpura, lóbulos del estigma 8 a 10, blancos; fruto verde, oblongo de 2 a 2.5 cm de largo.

Mammillaria grahamii Engelm. Biznaguita.

Reg. UACJ. JB3.

Uno de los cactus pequeños más hermosos. Tallos de más de 11 cm de altura y 8 de ancho. Espinas centrales de 1 a 3 con un solo garfio central. Flores rosas de 1 pulgada de ancho, ocurren solas o en grupos, florea de mayo a junio.

Coryphantha sneedii (N. Britton & J. Rose) A. Berger.

Reg. UACJ.JB31.

Tallos de 1-2 cm de ancho y 10 cm de alto, que crecen en grupos, espinas delgadas, que salen erectas de cualquier áreola, de 2 a 5 mm de largo; flores amarillo pálido a rosa o casi blancas, no se abren completamente, de 1.5 cm de ancho; fruto elongado de 1-1.5 cm de largo rojizo, florece en abril.

Coryphantha strobiliformis (Poselger) Moran. Biznaguita.

Reg. UACJ.JB53.

Tallos solitarios, muy pocos en grupos; tallos individuales de 2 a 4 cm de ancho y 10 cm de alto; tubérculos en tallos maduros presentan una ranura en la parte superior; espinas 20

a 25 por áreola, blancas, algunas veces amarillentas o cafesosas; delgadas en un 70%; flores amarillo pálido a rosa, no abren completamente, estigmas blancos a rosas; fruto elongado de 1.5 a 2 cm de largo, verde algo rojizo. Florece de abril a mayo.

Opuntia arenaria Engelm. Nopal de dunas.

Reg. UACJ. JB22.

Tallos articulados, planos de 8 cm de largo y 2-3 cm de ancho; áreolas en grupos densos de gloquidios amarillentos; rizomas con gloquidios; espinas en áreolas, 3 a 10 por áreola; espinas en ovario y fruto más pequeño; flores amarillas de 3 a 6 cm, estigmas verdes. Florece de mayo a junio.

Opuntia engelmannii Salm-Dyck Engelm. Nopal.

Reg. UACJ. JB50.

Arbustos muy extendidos de hasta 2 metros de altura; artículos orbitales u oblongos, de 20 a 30 cm de longitud, color verde pálido; áreolas distantes, glóquidas numerosas de color café con las puntas amarillas; espinas cuando existen 3 a 4, o una sola; flor amarilla de 9 cm de diámetro; fruto rojo de 3.5 a 4 cm de diámetro. Florece de abril a mayo.

Opuntia violácea var. macrocentra Engelm. Nopal.

Reg. UACJ. JB37.

Plantas de 60 a 90 cm de altura, que pueden ser arborescentes; artículos oblongos u orbitales, de color azulado o purpurino; las espinas son largas, se encuentran en las áreolas superiores en número de 1 a 2, de color negro; flor amarilla, fruto color púrpura. Florece de mayo a junio.

Opuntia leptocaulis A. P. de Candolle. Tasajillo.

Reg. UACJ. JB2.

Planta arbustiva a veces con un tronco corto; de hasta 2 metros de altura; ramas delgadas y poco tuberculadas; las áreolas sobre tubérculos poco prominentes; pequeñas y redondas con gloquideos abundantes y amarillentos provistos de un fieltro blanco; en general poseen una espina, son claras de hasta 5 cm de longitud, encerradas en una vaina; flores pequeñas, verdosas o amarillas; fruto globoso, de 1 cm de longitud, de color rojo o amarillo, provistos de áreolas que pueden dar lugar a nuevas vegetaciones. Florece de marzo a julio.

Opuntia imbricata (Haw) De Candolle. Choya

Reg. UACJ. JB41.

Plantas arborescentes, hasta de 3 o más metros de altura, tronco leñoso, con numerosas articulaciones, tubérculos de 2 a 2.5 cm de longitud, lateralmente aplanados, espinas 8 a 30, provistas de vainas papiráceas, de 2 a 3 cm de longitud; flores púrpura de 4 a 6 cm de longitud, fruto desnudo amarillento.

Florece en junio.

*Ejemplares depositados en el Herbario y Jardín Botánico de la UACJ.

RESULTADOS

1. Se han localizado a la fecha 5 géneros y 15 especies de cactáceas en la región conocida como Médanos de Samalayuca.
2. El tipo de vegetación que alberga mayor número de estas especies es el pastizal amacollado, y le siguen en importancia el matorral inerme parvifolio y el matorral de médanos.
3. El pastizal amacollado se encuentra en las dos sierras que circundan la zona, resultando el hábitat preferido por los cactus.
4. Las cactáceas del género *Echinocereus* resultaron ser las más abundantes, siguiendo el género *Opuntia*.
5. La *Opuntia arenaria* y el *Echinocactus parry* se encuentran en la NOM -059-ECOL-2000 con estatus de "protección especial" y "amenazada", respectivamente.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. En los Médanos de Samalayuca se han encontrado hasta la fecha 5 géneros y 15 especies de cactáceas, en su mayoría endémicas.
2. El *Echinocactus parry*, la *Opuntia arenaria*, la *Coryphantha sneedii* y *C. strobiliformis* son algunos de los ejemplares de cactus con estatus de amenazadas, raras o en peligro de extinción, por lo que debe ser controlada su extracción.
3. La región de los Médanos de Samalayuca, es una zona de características únicas en el mundo, en cuanto a diversidad de flora y fauna, formación de dunas tipo akle, y en existencia de especies con estatus oficial.
4. Por sus características de singularidad, debe ser objeto de protección y conservación, así como de más estudio.
5. Se recomienda incluir en el estatus oficial de área natural terrestre protegida.
6. Por las alteraciones que en la actualidad están sufriendo sus ecosistemas por las actividades de extracción, así como ganadera, agrícola e industriales, esta región está en peligro de verse perturbada en grado serio, así como las especies de flora y fauna que en ella tienen su hábitat natural, por lo que se hace un llamado a las autoridades para que implanten programas de manejo y culturales para la población en general.

REFERENCIAS

- Altamirano, F. A. Luévano. (1995). *Diagnóstico ambiental del aprovechamiento de los Médanos de Samalayuca*. Departamento de Ecología. Dir. Gral. de Desarrollo Urbano y Ecología. Gobierno Estado de Chihuahua (documento sin publicar).
- Arias, S. (1993). "Cactáceas: conservación y diversidad en México". *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 44, 19-25.
- Arias, S. (1993) "Cactáceas. Conservación y diversidad en México". *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 44, 19-115.
- Arreola, H. J. (1997). "Formas de vida y características morfológicas". *Suculentas mexicanas. Cactáceas*, pp 27-35.
- Axelrod, D. I. (1950). "Evolution of desert vegetation in western North America". Carnegie Institution Washington. Publ. 590, Washington, D. C.
- Barthlot, W., D.R. Hunt. (1993). "Cactaceae". In: *The family and genera of vascular plants*. Vol. II, Flowering plants, dicotyledons., Berlin, Springer – Verlag.
- Bach's cactus nursery (1976). *Merchants Publ. Company*. U.S. Distributor: Tucson, Az. Pp. 2-21.
- Barraza, L. R. Díaz, I. Enríquez, A. Gatica, P. Olivas, R. Rivas, y R. Barrón. (1997). Ordenamiento ecológico territorial de los médanos de Samalayuca. Gob. del Estado de Chihuahua-UACJ.
- Bravo. (1937). *Las cactáceas de México*. México: Inst. de Biología. Pp.356, 448, 458, 619.
- Bravo, H. (1997). *Suculentas mexicanas. Cactáceas*. Semblanza histórica. Pp. 10-15.
- Bravo, H., Scheinvar, L. (1995). *El interesante mundo de las cactáceas*. México: CONACYT. Pp. 9-14.
- CONABIO (1999). *Regiones prioritarias terrestres*. Mapa región 48: Samalayuca.
- COTECOCA, SARH (1978). "Tipos de vegetación, sitios de productividad forrajera y coef. de agostadero para el Estado de Chihuahua".
- COTECOCA (1994). *Revegetación y reforestación de las áreas ganaderas en las zonas áridas y semiáridas de México*. México: SARH. Pp. 11-24.
- Enriquez, I., Olivas, P. (1999). "La vegetación de nuestro desierto: Samalayuca, un ambiente fascinante". *Rev. Ciencia en la frontera*, vol.1, núm. 1, 33-37.
- Estrada, E., Spellenberg, R., Lebgue, T. (1997). "Flora vascular de la laguna de Babícora, Chihuahua, México. *Sida* 17 (4), 809-827.
- García, E. (1973). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. México: Inst. de geografía, UNAM.
- Gibson, C.A., Nobel, P.S. (1986). *The cactus primer*. Cambridge, Harvard University Press.
- Guzmán, L. (1997). "Grupos taxonómicos". *Suculentas mexicanas. Cactáceas*, pp. 37-41.
- Hatch, S., Gandhi, K., Brown, L. (1998). *Check list of the vascular plants of Texas*. Herbarium of Texas A & M Univ. Dept. of Biology. On-line botanical data.
- Herbario de la UACJ (2000). "Lista de especies florísticas de Samalayuca".
- Humphrey, R. (1958). "The desert grassland". *Agr. Exp. Sta. Bull.* 299 University of Tucson, Az, p. 4.
- INEGI (1998). *Diccionario de datos de uso del suelo y vegetación*. México: INEGI. Pp 5-12.
- INEGI (1970). *Carta de climas 138 – I*. México: INEGI.
- INEGI (1992). *Carta topográfica Esc.1: 250,000 H13 – I*. México: INEGI.
- Johnston, M. C. (1977). "Brief resume of botanical including vegetational features of The Chihuahuan desert region with special emphasis on their uniqueness. Symposium on the biological resources of Chihuahuan desert region. National Park Service. Transaction and proceeding series". Univ. Austin, TX, pp 351-354.
- Jones, S. Wipff, J., Montgomery, P. (1997). *Vascular plants of Texas*. A comprehensive checklist uncluding synonymy, bibliography, and index. Univ. of Texas Austin. Pp.85-90.
- Kearney, T., Peebles (1960). *Arizona flora*. Univ. of California Press. Pp. 1061.
- Kliem, Gretchen (2000). "Tuhe purple prickly pear. Understanding its pollination Biology. The Chihuahuan desert discovery". *Magazine*, Dec., 6-7.
- Lebgue, T., Valerio A. (1991). *Gramíneas de Chihuahua. Manual de identificación*. UACH, Col. Textos universitarios.
- Lesueur, H. (1945). *The ecology of the vegetation of Chihuahua, Mexico, north parallel twenty eight*. The University of Texas publ. Pp. 52-79.
- Morton, H., Hull, H. (1973). "Morphology and phenology of desert shrub. Arid shrublands. Oubl. BBNHA. Proceedings of the third workshop of the Unites States/ Australia rangelands panel". Tucson, Az. P. 39.
- Roalson, E., Allred K. (1998). "A working index of New Mexico plant names". Ed. 1. NMSU. Agr. Exp. Sta. Research reporte 702. Supl. 1:1(1995)1:2(1995), 1:4(1998). Varias pp.
- Pieper, Rex., Rea, K., Fraser, J. (1974). "Ecological characteristic of walkingstick cholla". *Agr. Exp. Sta. NMSU. Bull.* 623, 4-10.

- Pizzetii, M. (1988). *Guía de cactus*. México: Ed. Grijalbo. Pp. 10-31.
- Powell, M. (1988). *Trees and shrubs of trans-Pecos*, Texas. Including Big Bend and Guadalupe Mountains National Park. Pp 9-37. Dept. of Biology. Sull Ross State University.
- Preston-Mafhaw, R & K.(1998). *Cacti. The illustrated dictionary*. Pp. 33-45.
- Pronatura. WWF.1998. Deserts are full of life, help us preserve it. Bull. S/n. pp.17-24.
- Rodriguez, B., Porras, M. (1985). *Botánica sistemática*. UACH, Impr. Univ. Pp. 267-274.
- Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*. México: Ed. Limusa.
- Rzedowski. (1994). *Flora del bajo y regiones adyacentes*.
- SEMARNAP (2000). *Diario Oficial de la Federación*. Norma Ofic. Mexicana. Pp. 2-17.
- Solomón, E., Berg, L., Martin, D., Villedo, C. (1996). *Biología de Villedo*. 3a. Ed. Interamericana, Mac Graw-Hill. Pp. 185-187.
- Warnock, B. (1975). *Wildflowers of The Guadalupe mountains and the sand dune country*, Texas: Sull Ross State Univ. Pp. 95-99.
- West, Steve (2000). *Northern Chihuahuan desert. Wildflowers. Falcon guide*. Pp. 50-55.
- Wootton, E., Standley, P. (1972). *Flora of New Mexico*. Vol. 7. Ed. By J. Cram. New York.

CITAS ELECTRÓNICAS

- Agency status of NM rare plants. 2001 New Mexico rare plants. <http://nmrareplants.unm.edu/nmrptc/agency.htm>. pp. 1 - 11.
- Ferguson, D. 1998. *Opuntia arenaria*. Rare plants report. NMSU. <http://nmrareplants.unm.edu/reports/escsne.htm>. Pp. 1-2.
- Ferguson, D. 1998. Sneed's pincushion cactus (*Escobaria sneedii*). Rare plants report. NMSU. <http://nmrareplants.unm.edu/reports/escsne.htm>. pp 1 - 3.
- Ferguson, D. 1998. *Escobaria orcuttii*. Rare plants reports. NMSU. <http://nmrareplants.unm.edu/reports/escsne.htm>. Pp. 1-2
- Soc. Mexicana de cactología., A.C. 2001. Las cactáceas y suculentas de México, pp.1 <http://www.cactus-mall.com/smc/scerca.html>.
- Technical council. 1999. New Mexico rare plants list. Albuquerque, NM. home page. <http://nmrareplants.unm.edu> (versión 15 march 2001).

TAXONOMÍA, ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE Hongos macromicetos de Bosque Modelo, Chihuahua

Miroslava Quiñónez-Martínez* y Fortunato Garza-Ocañas*

Se realizó un estudio sobre la diversidad taxonómica, distribución e importancia de 102 especies de hongos colectados en el área de influencia de Bosque Modelo Chihuahua, en el estado de Chihuahua. La vegetación está formada por bosques templados de pinos y encinos. Se determinaron 102 taxa, conformados por 89 especies y 13 géneros en 29 familias. La lista micoflorística que se presenta incluye 1 Myxomycete, 6 Ascomycetes, 84 Basidiomycetes y 11 Gasteromycetes.

INTRODUCCIÓN

Chihuahua es uno de los estados madereros más importantes de México. Los bosques de coníferas (*Pinus spp.*) y de encinos (*Quercus spp.*) están ampliamente distribuidos en la región oeste del estado. Los hongos macroscópicos son un recurso forestal poco aprovechado y prácticamente desconocido en la región norte de México. Esto se debe a la falta de conocimiento de la taxonomía y biología de este importante grupo de organismos.

En México son escasos los estudios micoflorísticos, como es el caso del estado de Chihuahua, que a pesar de que cuenta con una gran superficie forestal, han sido pocas las investigaciones de carácter micológico que se han realizado. En los últimos 10 años es cuando más esfuerzos se han hecho en este sentido, pues ya se cuenta con algunos listados taxonómicos: Pérez-Silva y Aguirre-Acosta (1986), Laferrière y Gilbertson (1992) y Moreno-Fuentes y col. (1994). Aunado al valor económico que suponen las comunidades forestales, éstas también representan un importante acervo de recursos bióticos (génicos) potenciales que en algunos casos únicamente encontramos en esta región, tales como *Picea chihuahuana Martínez*, que es una pinácea endémica de los estados de Chihuahua y Durango. Esta especie ha sido intensamente explotada, por lo que actualmente se considera en peligro de extinción (Silva-Rodríguez, 1990).

Moreno-Fuentes y col. (1994) realizaron una revisión bibliográfica exhaustiva de los diferentes trabajos donde se reportan macromicetos del estado de Chihuahua; revelando las siguientes tendencias: 343 especies distribuidas en 133 géneros y 51 familias. Las recolecciones provienen de 7 de los 67 municipios con los que cuenta el estado, siendo los más estu-

diados en orden decreciente: Bocoyna (148 especies, 70 géneros y 30 familias); Temósachi (108, 71 y 29, respectivamente); Guachochi (74, 43 y 20) e Hidalgo del Parral (26, 12 y 8, respectivamente). Entre los géneros mejor representados encontramos: *Amanita*, *Lactarius*, *Polyporus*, *Boletus*, *Russula*, *Cortinarius*, *Agaricus* y *Lycoperdon*. En cuanto a familias, se refiere: *Polyporaceae*, *Boletaceae*, *Russulaceae*, *Amanitaceae* y *Cortinariaceae*, por citar algunas.

Montoya (1992) registró 15 especies del género *Lactarius* conocidas en México para el estado de Chihuahua; entre las especies más representativas se encuentran: *Lactarius deliciosus*, *L. torminosus*, *L. uvidus*, *L. salmonicolor*, *L. zonarius*, *L. chrysoreus*, *L. indigo*, *L. volemus*, entre otras. Pérez-Silva y Herrera (1991) reportaron 13 especies del género *Amanita* para el estado de Chihuahua, mencionando a: *Amanita caesarea*, *A. spreata*, *A. vaginata*, *A. gemmata*, *A. pantherina*, *A. virosa*, *A. flavoconia*, *A. flavorubescens*, *A. rubescens*, *A. solitaria*, *A. polypyramis* y *A. chlorinosma*.

El programa Bosque Modelo Chihuahua se desarrolla en la parte central del macizo forestal del estado de Chihuahua, en la que se distribuye una gran riqueza natural con una diversidad de oportunidades de desarrollo. Esta región se caracteriza por tener un desarrollo socioeconómico muy bajo y paradójicamente contiene grandes riquezas naturales, lo cual la hace aún más importante para la realización de actividades tanto de investigación como productivas (Chacón y col., 1996). En Bosque Modelo Chihuahua se reconoció que la educación tiene que formar parte de todo el proceso para conseguir una visión y un manejo integral de los recursos con la participación de todos los sectores y comunidades (Uribe, 1996). Para la implementación de sistemas de manejo integral, se requiere

* Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, ICB, Henri Dunant 4016, Zona Pronaf, Ciudad Juárez, Chih., México. C. P. 32310.

TABLA 1. Taxonomía de las especies descritas en el área de influencia de Bosque Modelo Chihuahua

TAXA
FUNGI
DIVISIÓN MYXOMYCOTA
CLASE MYXOMYCETES
ORDEN LICEALES
FAMILIA LYCOGALACEAE
1. <i>Lycogala epidendrum</i> (L.) Fr.
DIVISIÓN EUMYCOTA
CLASE ASCOMYCETES
ORDEN XYLARIALES
FAMILIA XYLARIACEAE
2. <i>Xylaria hypoxylon</i> (L. ex Hook.) Grev.
ORDEN HYPOCREALES
FAMILIA HYPOMYCETACEAE
3. <i>Hypomyces lactifluorum</i> (Schwein. Ex Fr.) Tul.
ORDEN PEZIZALES
FAMILIA PEZIZACEAE
4. <i>Aleuria aurantia</i> Fuckel.
5. <i>Macropodia macropus</i> (Pers. ex S.F. Gray) Fuckel.
FAMILIA HELVELLACEAE
6. <i>Paxina acetabulum</i> (L. ex St.- Amans) Kuntze.
ORDEN HELOTIALES
FAMILIA GEOGLOSSACEAE
7. <i>Spathularia flavida</i> Persoon ex Fries.
CLASE BASIDIOMYCETES
ORDEN APHYLLOPHORALES
FAMILIA CLAVARIACEAE
8. <i>Clavaria fistulosus</i>
9. <i>Clavaria vermicularis</i> Fr.
10. <i>Ramaria flava</i> (Fr.) Quéf.
FAMILIA CANTHARELLACEAE
11. <i>Cantharellus cibarius</i> Fr.
FAMILIA GANODERMACEAE
12. <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers. ex Wall.) Pat.
FAMILIA GOMPHACEAE
13. <i>Gomphus floccosus</i> (Schwein.) Singer.
FAMILIA STEREEAE
14. <i>Stereum complicatum</i> (Fr.) Fr.
15. <i>Stereum</i> sp. 1
16. <i>Stereum</i> sp. 2
FAMILIA POLYPORACEAE
17. <i>Albatrellus</i> sp.
18. <i>Coltricia perennis</i> Fr.
19. <i>Daedalea quercina</i> Fr.
20. <i>Phellinus robustus</i>
21. <i>Gloeophyllum sepiarium</i> (Fr.) Kar.
22. <i>Lenzites betulina</i> (Fr.) Fr.
23. <i>Phaeolus schweinitzii</i> (Fr.) Pat.
24. <i>Polyporus</i> sp.
ORDEN AGARICALES
FAMILIA AMANITACEAE
25. <i>Amanita alexandre</i>
26. <i>A. caesarea</i> (Fr.) Schw.
27. <i>A. flavoconia</i> Atk.
28. <i>A. flavorubescens</i> Atk.
29. <i>A. fulva</i> (Schaeff. ex) Pers.
30. <i>A. gemmata</i> (Fr.) Gill.
31. <i>A. magniverrucata</i> Thiers & Ammirati
32. <i>A. muscaria</i> (L. ex Fr.) Hooker.

33. <i>A. rubescens</i> (Pers. ex Fr.) S.F. Gray.
34. <i>A. vaginata</i> (Bull. ex Fr.) Vitt.
35. <i>A. variabilis</i>
36. <i>A. verna</i> (Bull. ex Fr.) Vitt.
37. <i>A. virosa</i> Secr.
38. <i>Amanita</i> sp.
FAMILIA AGARICACEAE
39. <i>Agaricus campestris</i> L. ex Fr.
40. <i>Agaricus silvaticus</i> Schaeff. ex Secr.
41. <i>Agaricus</i> sp.
42. <i>Cystoderma amianthinum</i> (Scop ex Fr.) Fay.
43. <i>Cystoderma granulosum</i> (Fr.) Fayod
FAMILIA LEPIOTACEAE
44. <i>Lepiota clypeolaria</i> (Bull ex Fr.) Kumm.
FAMILIA HYGROPHORACEAE
45. <i>Hygrophorus russula</i> (Fr.) Quéf.
FAMILIA COPRINACEAE
46. <i>Panaeolus antillarum</i> (Fr.) Dennis.
47. <i>Panaeolus campanulatus</i> (Bull. ex Fr.) Quéf.
48. <i>Panaeolus semiovatus</i> (Sow. Wx Fr.) Lund & Nannf.
49. <i>Psathyrella candolleana</i> (Fr.) Maire
FAMILIA STROPHARIACEAE
50. <i>Naematoloma fasciculare</i> (Huds. Ex Fr.) Karst.
51. <i>Psilocybe coprophila</i> (Bull. ex Fr.) Kumm.
52. <i>Stropharia semiglobata</i> (Batsch. Ex Fr.) Quéf.
FAMILIA TRICHOLOMATACEAE
53. <i>Armillariella mellea</i> (Vahl. Ex Fr.) Karst.
54. <i>Clitocybe gibba</i> (Fr.) Kumm.
55. <i>Clitocybe</i> sp.
56. <i>Collybia confluens</i> (Pers. ex Fr.) Kum.
57. <i>Laccaria bicolor</i> (Maire) Orton
58. <i>Laccaria laccata</i> (Scop. Ex Fr.) Berk. & Broome.
59. <i>Lyophyllum decastes</i> (Fr.) Sin.
60. <i>Marasmius androsaceus</i> (L. ex Fr.)
61. <i>Marasmius</i> sp.
62. <i>Melanoleuca melaleuca</i> (Pers. ex Fr.) Murr.
63. <i>Mycena pura</i> (Fr.) Quéf.
64. <i>Panellus stipticus</i> (Bull. ex Fr.) Kar.
65. <i>Tricholoma magnivelare</i> (Peck) Redhead
66. <i>Tricholoma ponderosa</i> (Pk.) Sacc.
67. <i>Tricholoma fulvum</i> (DC ex Fr.) Sacc.
68. <i>Xeromphalina caudicinalis</i> (Fr.) Kün & Maire.
FAMILIA CORTINARIACEAE
69. <i>Cortinarius semisanguineus</i> (Fr.) Gill.
70. <i>Cortinarius</i> sp.
71. <i>Gymnopilus</i> sp.
72. <i>Hebeloma crustuliniforme</i> (Bull ex St. Amans) Quéf.

de la participación interdisciplinaria de las instituciones que influyen en el sector forestal y agropecuario; por ello, es importante destacar la participación en este Programa de las diferentes estancias institucionales que se han sumado al esfuerzo de Bosque Modelo Chihuahua, entre las que destacan SEMARNAP, Gobierno del Estado, INIFAP, Unidad Forestal No. 5, Universidad Autónoma de Chihuahua, Presidencia Municipal de Bocoyna, Sector Educativo, Sector Salud, entre otras (Chacón y col., 1996).

LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó en el macizo montañoso de la Sierra Madre

FAMILIA CREPIDOTACEAE
73. <i>Crepidotus mollis</i> (Schaeff. ex Fr.) Kummer.
FAMILIA ENTOMATACEAE
74. <i>Entoloma</i> sp.
FAMILIA RUSSULACEAE
75. <i>Lactarius deliciosus</i> (L. ex Fr.) S.F. Gray.
76. <i>L. torminosus</i> (Schaeff. ex Fr.) S.F. Gray.
77. <i>L. uvidus</i> (Fr.) Fr.
78. <i>Russula emetica</i> (Schaeff. ex Fr.) S.F. Gray.
79. <i>R. cyanoxantha</i> Schaeff. ex Fr.
80. <i>Russula brevipes</i> Pk.
FAMILIA BOLETACEAE
81. <i>Boletellus russellii</i> (Frost) Gilbert.
82. <i>Boletus frostii</i> Russ. apud Frost
83. <i>B. pinophilus</i> Pilat & Dermek.
84. <i>B. variipes</i> Peck.
85. <i>Suillus americanus</i> (Peck) Snell.
86. <i>S. brevipes</i> (Pk.) Kuntze.
87. <i>S. granulatus</i> (Fr.) Kuntze.
88. <i>S. pictus</i> (Pk.) A.H.S. & Thiers.
89. <i>S. pseudobrevipes</i> Smith & Thiers.
90. <i>S. tomentosus</i> (Kauff.) Singer.
91. <i>Xerocomus</i> sp.
CLASE GASTEROMYCETES
ORDEN LYCOPERDALES
FAMILIA LYCOPERDACEAE
92. <i>Calvatia cyathiformis</i> (Bosc.) Morgan.
93. <i>Lycoperdon perlatum</i> Pers.
94. <i>L. pusillum</i> Batsch.
95. <i>L. equinatum</i> (Pers. ex Pers.)
ORDEN SCLERODERMATALES
FAMILIA ASTRAEACEAE
96. <i>Astraeus hygrometricus</i> (Pers.) Morgan.
FAMILIA SCLERODERMATACEAE
97. <i>Scleroderma areolatum</i> Ehr.
ORDEN NIDULARIALES
FAMILIA NIDULARIACEAE
98. <i>Cyathus stercoreus</i> (Schwein.) De Toni.
99. <i>C. striatus</i> Huds. ex Pers.
100. <i>Crucibulum laevis</i> (Huds.) Kamb.
ORDEN HYMENOGASTRALES
FAMILIA RHIZOPOGONACEAE
101. <i>Rhizopogon</i> sp.
ORDEN USTILAGINALES
FAMILIA USTILAGINACEAE
102. <i>Ustilago maydis</i> (DC.) Corda.

¹ Número de página de la descripción macroscópica y microscópica de la especie correspondiente.

Occidental a 220 km al suroeste de la ciudad de Chihuahua, México, dentro del área de influencia de Bosque Modelo Chihuahua, comprendiendo ocho ejidos: Bocoyna, San Juanito, Creel, Gumeachi, El Ranchito, Arareco, Cusárare y Choguaita. El área comprende una superficie aproximada de 110,000 hectáreas, correspondiendo geográficamente a un cuadrángulo ubicado entre los 27°30' y 28°30' latitud norte y entre los 107°00' y 108°00' longitud oeste (Figura 1 y 2). La altitud media es de 2,350 msnm, con una altitud máxima de 3,400 msnm y mínima de 970 msnm (UF 5, 1993). En esta región, el aprovechamiento agroforestal constituye la base de las actividades económicas.

METODOLOGÍA

Para la recolecta de hongos, durante los meses de julio a septiembre de 1998, se realizaron cinco exploraciones, concentrándose en zonas representativas de las principales áreas ya mencionadas que comprenden la zona de influencia de Bosque Modelo Chihuahua, con base en accesibilidad y conservación forestal. El material fue herborizado siguiendo las recomendaciones de Cifuentes y col. (1986), registrándose las características macroscópicas del material en fresco.

El estudio y caracterización de las estructuras microscópicas consistió en realizar preparaciones temporales de cortes del himenóforo en KOH 5% y solución de Melzer. La identificación se realizó mediante la comparación de los datos macroscópicos y microscópicos con literatura especializada tales como: Hanlin (1990) y San Martín (1998) para *Ascomycetes*, Pacioni (1982), Singer (1986), Lincoff (1988) y García y col. (1998) para todos los grupos. El material fúngico identificado se depositó en el herbario micológico de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), con algunos duplicados en el herbario de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria.

RESULTADOS

Clasificación

Se determinaron 102 taxa, 89 de ellos a nivel específico y 13 a nivel genérico. La división *Myxomycota* quedó representada por una familia, mientras que la División *Eumycota* está representada por 29 familias, de las cuales 5 pertenecen a la subdivisión *Ascomycotina* y 24 a la subdivisión *Basidiomycotina*, de las cuales 18 pertenecen a la subclase *Basidiomycete* y 6 a la subclase *Gasteromycete*. Todo lo anterior se presenta ordenado taxonómicamente en la Tabla 1.

Sustrato

De los 102 taxa determinados, 76 especies se encontraron creciendo sobre mantillo, 13 especies sobre madera muerta, principalmente troncos tirados, mayormente representados por especies de la familia *Ganodermataceae*, *Stereaceae* y *Polyporaceae*, 6 especies creciendo sobre árboles vivos, que incluyen las especies *Ganoderma applanatum*, *Phaeolus schweinitzii* y *Phellinus robustus*, 6 especies sobre estiércol, principalmente las especies: *Paneolus antillarum*, *Paneolus campanulatus*, *Psilocybe coprophila*, *Stropharia semiglobata*, *Cyathus stercoreus* y *Cyathus striatus*, localizados aisladamente en las regiones de Arareco, Gumeachi y San Juanito principalmente, lo cual indica poca presencia de ganado, y una especie sobre otro hongo correspondiente a *Hypomyces lactifluorum* creciendo sobre *Russula brevipes*, encontrándose en Gumeachi, Arareco y Choguaita.

TABLA 2. Taxa reconocidos como comestibles, tóxicos, medicinales, alucinógenos y destructores de la madera

Comestibles	No comestibles	No comestibles Tóxicos	Medicinales	Destructores de la madera
<i>Agaricus campestris</i>	<i>Agaricus sp.</i>	<i>Amanita alexandre</i>	<i>Calvatia cyathiformis</i>	<i>Daedalea hercina</i>
<i>Agaricus silvaticus</i>	<i>Albatrellus sp.</i>	<i>A. flavoconia</i>	<i>Clavaria vermicularis</i>	<i>Ganoderma</i>
<i>Aleuria aurantia</i>	<i>Amanita flavorubescens</i>	<i>A. gemmata</i>	<i>Ganoderma applanatum</i>	<i>applanatum</i>
<i>Amanita caesarea</i>	<i>Amanita sp.</i>	<i>A. magniverrucata</i>	<i>Lycoperdon equinatum</i>	<i>Lenzites betulina</i>
<i>A. fulva</i>	<i>Astraeus hygrometricus</i>	<i>A. muscaria***</i>	<i>L. perlatum</i>	<i>Phaeolus schweinitzii</i>
<i>A. rubescens</i>	<i>Clavaria fistulosus</i>	<i>A. verna *</i>	<i>L. pusillum</i>	<i>Phellinus robustus</i>
<i>A. vaginata</i>	<i>Clavaria vermicularis</i>	<i>A. virosa *</i>	<i>Ramaria flava</i>	<i>Stereum complicatum</i>
<i>A. variabilis</i>	<i>Clitocybe sp.</i>	<i>Cortinarius semisanguineus</i>	<i>Ustilago maydis</i>	
<i>Armillariella mellea</i>	<i>Coltricia perennis</i>	<i>Cortinarius sp.</i>		
<i>Boletellus russellii</i>	<i>Collybia confluens</i>	<i>Hebeloma crustuliniforme</i>		
<i>Boletus frostii</i>	<i>Crepidotus mollis</i>	<i>Lactarius torminosus</i>		
<i>B. pinophilus</i>	<i>Crucibulum laevis</i>	<i>Lepiota clypeolaria</i>		
<i>B. variipes</i>	<i>Cyathus stercoreus</i>	<i>Naematoloma fasciculare</i>		
<i>Calvatia cyathiformis</i>	<i>Cyathus striatus</i>	<i>Paneolus semiovatus</i>		
<i>Cantharellus cibarius</i>	<i>Cystoderma amianthinum</i>	<i>Paxina acetabulum</i>		
<i>Clitocybe gibba</i>	<i>Cystoderma granulorum</i>	<i>Psilocybe** coprophila</i>		
<i>Gomphus floccosus</i>	<i>Daedalea hercina</i>	<i>Russula emetica</i>		
<i>Hygrophorus russula</i>	<i>Entoloma sp.</i>	<i>Scleroderma areolatum</i>		
<i>Hypomyces lactifluorum</i>	<i>Ganoderma applanatum</i>	<i>Stropharia** semiglobata</i>		
<i>Laccaria bicolor</i>	<i>Gloeophyllum sepiarium</i>			
<i>Laccaria laccata</i>	<i>Gymnopilus sp.</i>			
<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Lactarius uvidus</i>			
<i>Lycoperdon perlatum</i>	<i>Lenzites betulina</i>			
<i>L. pusillum</i>	<i>Lycogala ephidendrum</i>			
<i>L. echinatum</i>	<i>Marasmius androsaceus</i>			
<i>Lyophyllum decastes</i>	<i>Marasmius sp.</i>			
<i>Macropodia macropus</i>	<i>Panellus stipticus</i>			
<i>Melanoleuca melaleuca</i>	<i>Paneolus antillarum</i>			
<i>Mycena pura</i>	<i>Paneolus campanulatus</i>			
<i>Psathyrella candolleana</i>	<i>Phaeolus schweinitzii</i>			
<i>Ramaria flava</i>	<i>Phellinus robustus</i>			
<i>Russula brevipes</i>	<i>Polyporus sp.</i>			
<i>Russula cyanoxantha</i>	<i>Rhizopogon sp.</i>			
<i>Suillus americanus</i>	<i>Spathularia flavida</i>			
<i>S. brevipes</i>	<i>Stereum complicatum</i>			
<i>S. granulatus</i>	<i>Stereum sp. 1</i>			
<i>S. pictus</i>	<i>Stereum sp. 2</i>			
<i>S. pseudobrevipes</i>	<i>Xeromphalina caucinalis</i>			
<i>S. tomentosus</i>	<i>Xylaria hypoxylon</i>			
<i>Tricholoma fulvum</i>	<i>Xerocomus sp.</i>			
<i>Tricholoma magnivelare</i>				
<i>T. ponderosa</i>				
<i>Ustilago maydis</i>				

*especies consideradas mortales

**especies consideradas alucinógenas

Hábito

De acuerdo a los 102 taxa determinados, se consideran 39 especies como saprobias, éstas son principalmente especies de la familia *Agaricaceae*, *Lepiotaceae*, *Polyporaceae*, *Stereaceae* y algunos de la familia *Tricholomataceae*, siendo las localidades de Arareco y El Ranchito las de mayor abundancia, indicando que son zonas que presentan un suelo con alta capa de mantillo, mayor reciclamiento de materia orgánica y por ello con mayor conservación, en contraste con Choguita, Bocoyna y Creel, que son zonas de suelos más desnudos, indicador de escaso crecimiento de estos hongos y por lo tanto con mayor perturbación. Se consideran 49 especies que

pueden ser clasificadas como probables hongos ectomicorrízicos, de acuerdo a Garza (1986) y García y col. (1998), representados principalmente por especies de la familia *Amanitaceae*, *Tricholomataceae* y *Boletaceae*, lo cual es altamente significativo, ya que determinan en gran medida el mantenimiento ecológico de los bosques. Las localidades con mayor presencia de especies micorrízicas fueron Arareco, Cusárare, Gumeachi y El Ranchito, indicadores de ser zonas con bajo disturbio, esto se debe a que las primeras dos áreas son zonas turísticas y las dos últimas zonas de regeneración; Gumeachi presenta zonas de regeneración de *Pinus arizonica* y El Ranchito de *Picea chihuahuana*. Las localidades con

menor número de especies micorrícicas son: Creel, Chogueta y San Juanito, donde los factores antropogénicos tales como: la tala inmoderada, cambio de uso de suelo y la contaminación por basura generan un efecto negativo para el desarrollo de los hongos y por lo tanto rompen el equilibrio existente en estos bosques, de ahí el bajo número de especies. Se registran siete especies parásitas, principalmente las especies: *Ganoderma applanatum*, *Phaeolus schweinitzii*, *Phellinus robustus*, *Lenzites betulina*, *Armillariella mellea*, *Hypomyces lactifluorum* (sobre *Russula brevipes*) y *Ustilago maydis* (creciendo sobre plantas de maíz), siendo estas tres últimas especies comestibles, seis coprófilas, básicamente en las áreas de Gumeachi, Arareco y San Juanito. Las especies que se clasifican dentro de este hábito pertenecen a las familias *Copriniaceae*, *Strophariaceae* y *Nidulariaceae*. Se presenta una especie fagotrófica correspondiendo esta última a *Lycogala epidendron*.

Importancia por uso potencial

De las 102 especies determinadas, 43 son consideradas comestibles, éstas presentan en general la consistencia carnosa, de olor y sabor agradable y son digeribles cuando se consumen a discreción, lo cual justifica el aprovechamiento de los hongos silvestres con fines alimenticios. Se sabe que la población sólo consume tradicionalmente unas cinco especies tales como: Morochike (*Amanita caesarea*), Sojachi (*Amanita rubescens*), Trompa de cochi (*Hypomyces lactifluorum*), Llanero o Sakirakua (*Agaricus campestris*) y duraznillo (*Cantharellus cibarius*), desconociéndose que existen más hongos silvestres igual o de mejor calidad como las 38 especies restantes determinadas en este estudio, o bien, el temor de consumir especies venenosas. Asimismo, se clasifican 59 especies como no comestibles, principalmente por su consistencia dura o mal sabor, por lo cual no pueden ser usadas como alimento, se incluyen las especies de las que se desconoce su comestibilidad. Dentro de esta categoría se incorporan 19 especies consideradas como tóxicas. Se presentan ocho consideradas medicinales; *Ganoderma applanatum*, *Calvatia cyathiformis*, *Clavaria vermicularis*, *Lycoperdon equinatum*, *L. pusillum*, *L. perlatum*, *Ustilago maydis*, y *Ramaria flava*, basado en el conocimiento tradicional de diferentes grupos indígenas en varias regiones de México.

Se registran seis especies destructoras de la madera, aunque es importante resaltar que la mayoría se encontraba sobre tronco tirado, lo cual indica que no son parásitos a excepción de *Ganoderma applanatum*, *Phaeolus schweinitzii* y *Phellinus robustus*, los cuales se encontraron creciendo sobre encino vivo.

Con respecto a localidad, Arareco, seguida por Cusárare y El Ranchito son las zonas que pueden considerarse con ma-

Especies de árboles (hospedero) y número de especies de hongo			
<i>Coníferas</i>		<i>Pseudotsuga menziessii</i>	3
<i>Pinus arizonica</i>	46	<i>Cupressus sp.</i>	1
<i>P. engelmannii</i>	9	<i>Encinos:</i>	
<i>P. ayacahuite</i>	19	<i>Quercus depressipes</i>	8
<i>P. lumholtzii</i>	6	<i>Q. mcvaughii</i>	7
<i>P. durangensis</i>	19	<i>Q. rugosa</i>	9
<i>P. chihuahuana</i>	3	<i>Q. arizonica</i>	9
<i>P. herrerae</i>	1	<i>Q. sideroxylla</i>	6
<i>P. leiophylla</i>	2	<i>Arboles y arbustos:</i>	
<i>Picea chihuahuana</i>	15	<i>Arctostaphylos pungens</i>	6
<i>Abies duranguensis</i>	5	<i>Arbutus xalapensis</i>	2
<i>Juniperus deppeana</i>	5	<i>Salix nigricans</i>	1

yor uso potencial de hongo comestible silvestre. Asimismo, en cada una de las localidades el número de especies comestibles es mucho mayor al de especies tóxicas (Cuadro 7).

La tabla 2 muestra los taxa reconocidos como comestibles, no comestibles, tóxicos, alucinógenos, medicinales y destructores de la madera, según Garza (1986), García y col. (1998), Guzmán (1979) y González (1985).

Aspectos fenológicos

Después de realizar cinco colectas durante los meses de julio a septiembre de 1998, se logró obtener para el mes de julio 35 especies, en el que se presentaron las primeras lluvias y por ello, quizá no exista una variación muy marcada en el número de especies por localidad, a diferencia de agosto, en el que se identificaron 81 especies y las lluvias fueron más constantes, en este mes la mayor abundancia se presentó en Arareco, El Ranchito y posteriormente Cusárare.

Durante el mes de septiembre se colectaron 51 especies siendo las localidades de Cusárare y Arareco las de mayor abundancia seguidas por Gumeachi y El Ranchito. Cabe mencionar que la última colecta se realizó durante la última semana de septiembre, en la cual ya no se obtuvieron especies frescas y las lluvias habían terminado. Es importante resaltar que la mayor parte de los hongos registrados en este estudio se desarrollaron durante el periodo estacional de mayor precipitación en el mes de agosto y a principios de septiembre al final de las lluvias, lo cual determina aspectos fenológicos importantes, ya que algunas especies sólo se encontraron en las primeras lluvias durante el mes de julio, específicamente *Marasmius androsaceus*, *Agaricus campestris* y *Lyophyllum decastes*, siendo estas dos últimas especies comestibles.

Asimismo, a fines de septiembre, cuando las lluvias cesaron, sólo se encontraron algunas especies como: *Ustilago maydis* y *Rhizopogon sp.*, también comestibles, por ello es importante realizar estudios de estimaciones sobre la producción de hongos comestibles por localidad, ya que puede presentarse una sucesión en los periodos de fructificación de los hongos, teniendo una mayor seguridad de la productividad fúngica en

estos ecosistemas forestales y así realizar programas de manejo sustentable de este recurso.

Especies arbóreas asociadas

Se presentan 13 especies de coníferas asociadas al crecimiento de los hongos, mayormente *Pinus arizonica* con 46 especies de hongos, *P. ayacahuite* y *Pinus durangensis* con 19 especies cada una y *Picea chihuahuana* con 15 especies. Con respecto a encinos, se registraron 5 especies, principalmente *Quercus rugosa* y *Q. arizonica* asociadas al crecimiento de 9 especies de hongos cada una y *Q. depressipes* con 8 especies de hongos. Otras especies arbóreas tales como: *Arctostaphylos pungens* y *Arbutus xalapensis* se presentan asociadas al crecimiento de 6 y 2 especies de hongos, respectivamente (Tabla 3).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se estudiaron 102 especies de hongos de la región de Bosque Modelo Chihuahua, 43 especies son comestibles, 59 no comestibles, 2 mortales, 2 alucinógenas, 8 medicinales, 6 destructoras de la madera y 3 son parásitas de árboles.

Se registraron 49 especies como probables hongos ectomicorrícicos y 39 saprobios, determinantes en el mantenimiento ecológico del bosque. La diversidad de macromicetos fue más abundante en las localidades que presentaron menos disturbio como lo son: Arareco, Cusárare y El Ranchito.

En las localidades de Choguítta, Creel y Bocoyna se presentó la menor diversidad y abundancia de hongos, lo cual concuerda con el alto disturbio generado principalmente por la

tala inmoderada del bosque y el cambio de uso del suelo. La fenología de la producción de hongos ocurrió principalmente en el mes de agosto y principios de septiembre. En general, 13 especies de coníferas y cinco de encinos se encontraron asociadas al crecimiento de los hongos.

Por todo esto, se recomienda no alterar los bosques del área de influencia de Bosque Modelo, en los que se conoce que existe un alta diversidad de macromicetos, así como disminuir el alto disturbio de las zonas determinadas como tales, ya que lo contrario genera un efecto negativo para el desarrollo de los hongos.

Es necesario realizar más estudios sobre los efectos que proporcionan los hongos a las especies de pino y encino, para la aplicación de técnicas de micorrización en plántulas de vivero, lo cual permitirá la realización de programas de reforestación.

La micofagia por roedores mantiene en equilibrio a las poblaciones de hongos y estos últimos a los bosques, por lo que se recomienda no fomentar la eliminación de estos animales de los predios boscosos.

En las áreas productoras de hongos comestibles es importante no llevar a cabo aprovechamientos intensivos y constantes, ya que causaría su eliminación a largo plazo y el bosque perdería su equilibrio.

Se recomienda a los recolectores fomentar las técnicas de propagación vegetativa para la preservación de los hongos como una alternativa para disponer de ellos durante la siguiente época del año. Se sugiere consultar siempre a un experto o una buena guía de campo para identificar especies comestibles y nunca consumir hongos desconocidos.

REFERENCIAS

- Chacón S. J. M., Orta, V.R y col. (1996). "Bosque Modelo Chihuahua. La red en acción para el desarrollo forestal sustentable". Reunión de la red internacional de Bosque Modelo, Chihuahua, México.
- Cifuentes, J., M. B. Villegas, L. Pérez-Ramírez. (1986) *Hongos. Manual de Herbario*. México: Consejo Nacional de la Flora de México A. C. Pp. 55-64.
- García, J., D. Pedraza, C. I. Silva, R. L. Andrade y Castillo, J. (1998). *Hongos del estado de Querétaro*. 1a. edición. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Forestales. P. 263.
- Garza, F. (1986). "Hongos ectomicorrícicos en el estado de Nuevo León". *Revista Mexicana de Micología* 2, 197-205.
- González, I. (1993). IX Exposición de hongos. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Secretaría de Investigación Científica.
- Guzmán, G. (1980). "Las Intoxicaciones producidas por los hongos". *Ciencia y Desarrollo*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, núm. 32, 129 pp.
- Hanlin, T. R. (1990). *Illustrated Genera of Ascomycetes*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Herrera, T. y Pérez-Silva, E. (1997). "Micetismo cerebral provocado por especies de *Psilocybe* en México". VI Congreso Nacional de Micología. IX Jornadas Científicas. Tapachula, Chiapas.
- Laferriere, E. J., Gilbertson R. L. (1992). "Fungi of Nabogame, Chihuahua, México". *Mycotaxon*, 44. Pp. 73-87.
- Lincoff, G. H. (1981). *The Audubon Society Field Guide to North American Mushrooms*. New York: Alfred A. Knopf.
- Montoya, B. L. (1992). "Las especies de *Lactarius* (Fungi, Basidiomycotina) conocidas en México. Contribución al estudio monográfico del género". Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Moreno-Fuentes, A., Aguirre-Acosta. E., y col. (1994). "Estudio fungístico de los macromicetos en el municipio de Bocoyna, Chihuahua, México". *Rev. Mex. Mic.* 10. Pp. 63-76.
- Pacioni, G. (1982). *Guía de hongos*. 1ª edición. Barcelona, España: Grijalbo, S. A. P. 507.
- Pérez-Silva, E. y Aguirre-Acosta, E. (1986). "Flora Micológica del estado de Chihuahua, México I". *Inst. Biol.* 57. Pp. 17-32.
- Pérez-Silva, E., Herrera, T. (1991). Iconografía de Macromicetos de México. I *Amanita*. México: Instituto de Biología, UNAM, *Publicaciones especiales* 6.
- San Martin, F., Rogers, J. D. y Ju, Y. M. (1998). "Clave dicotómica provisional para los géneros de la familia *Xylariaceae* (*Pyrenomycetes*, *Sphaeriales*) de México". *Acta Botánica Mexicana*, 42. Pp. 35-41.
- Silva-Rodriguez, S. (1990). Caracterización de la flora y fauna silvestre de la Unidad de Conservación y Desarrollo Forestal No. 5. San Juanito-Creel. *U.C.D.F. No. 5*, Chihuahua, México.
- Singer, R. (1986). *Agaricales in moden taxonomy*. 4ª ed. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- UF5. Unidad Forestal 5, A. C. "Programas de Manejo Forestal". San Juanito, Chihuahua, México, 1993.
- Uribe, G. (1996). "Educación para el desarrollo sustentable. La red en acción para el desarrollo forestal sustentable". Reunión de la Red Internacional de Bosque Modelo, Chihuahua, México.

LA PROMESA DE LOS PROTEOMAS

Más allá del genoma

Joaquín Rodrigo García* y Guillermo Bojórquez Rangel*

Durante los últimos 20 años, los investigadores de todo el mundo han enfocado su trabajo en determinar los cerca de 3,000 millones de pares de bases que estructuran el genoma humano. Ello, bajo uno de los proyectos más ambiciosos: El genoma humano. Este está llegando a su fin y surgen nuevas interrogantes donde aparecen nuevos campos de investigación. Uno de ellos es el proteoma, este término aparece de los términos de proteínas y genomas, e intenta reconocer las funciones de cada producto de los genes: las proteínas. Para hacer esto hay diferentes herramientas de tecnología que han sido desarrolladas para cumplir dichos objetivos. En los próximos 15 años serán útiles como herramientas de diagnóstico de enfermedades. El proteoma tendrá un impacto en el entendimiento de la fisiopatología, la creación de nuevas drogas y la producción de vacunas. En nuestros días hay grandes inversiones por parte de los laboratorios con el fin de obtener estas tecnologías que nos permitan llegar a dichos objetivos.

Durante los últimos 15 años, la investigación en genética ha centrado su atención en la genómica estructural, la cual pretende conocer la secuencia de pares de bases que conforman el total de ADN contenido en cada célula (genoma) de las diversas especies. A la fecha se han completado los genomas de un número considerable de bacterias, en 1996 se dieron a conocer los resultados de la secuenciación del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; en 1999 se determinó el genoma del nemátodo *Caenorhabditis elegans* y en el 2000 el de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En lo relacionado con el ser humano, ya se anuncia la culminación del proyecto Genoma Humano, del cual ya se ha dado a conocer un primer marco de lectura que muestra el orden de los 3,000 millones de pares de bases que forman su información genética y dentro de la que se estima, existen entre 30,000 y 40,000 genes.

El establecimiento de las secuencias y mapas genéticos de las diversas especies que ya han sido terminadas, han generado bases de datos extremadamente complejas que han requerido la implementación de nuevas tecnologías y la aparición de nuevos campos de investigación. Si la genómica estructural se orienta a la caracterización y localización de las secuencias que forman el ADN de los organismos vivos, entonces la genómica funcional, tiene por objetivo determinar la función de cada uno de los genes que constituyen el genoma de una especie (Cowley, 1998).

Se ha estimado que el genoma humano contiene cerca de 40,000 genes, muchos de los cuales son transcritos a ARNm y a partir de esta molécula se sintetizan las proteínas. Desde 1994 se ha venido utilizando el término de transcriptoma para

referirse al estudio de los ARNm producto de la transcripción y el de proteomas, para señalar a las proteínas productos de la expresión de los genes. De este forma, han emergido dos nuevos campos del conocimiento: La Transcriptómica y la Proteómica.

Los transcriptomas involucran la identificación de los ARNm que son el primer producto de la expresión de un gen en un tiempo dado y que eventualmente son convertidos a proteínas. Este tiene la ventaja sobre los proteomas de disponer de tecnologías relativamente sencillas y automatizadas, sin embargo la correlación entre ARN y proteínas es pobre, por lo que proporcionan poca información sobre las proteínas y sus funciones.

En cambio, la proteómica se ha constituido como uno de los campos más prometedores de la biomedicina molecular. Los proteomas surgen de la fusión de dos términos: proteínas y genomas.

El concepto de proteomas hace referencia al estudio de los productos de expresión de los genes, las modificaciones post-transcripcionales y los cambios en la expresión de los mismos, así como las alteraciones en las concentraciones de las proteínas en las células de cada organismo. Después de la revolución de la biología molecular, cuyo principal aspecto son los métodos de aislamiento, secuenciación y clonación del ADN, y una vez realizada la identificación de tantos y tantos genes, nos encontramos con la paradoja de tenerlos identificados, pero realmente se sabe muy poco acerca de qué productos generan y para qué sirven. Por ello y tal y como se puede ver en muchos artículos científicos, los proteomas añaden

* Profesores investigadores del Instituto de Ciencias Biomédicas de la UACJ. Correos electrónicos: jogarcia@uacj.mx y gbojorqu@uacj.mx

dirán a nuestro entendimiento muchos aspectos en la bioquímica de proteínas, procesos y metabolismo en general (Pandey y Mann, 2000), por lo que estamos entrando en la era de los proteomas, tras haber superado la era de los genomas.

A diferencia de los genomas, que son relativamente constantes, los proteomas son extremadamente variables en tiempo y espacio y son influidos por una gran diversidad de factores. Esta visión dinámica de los proteomas lo hace mucho más interesante que los genomas. Bajo esta perspectiva, la proteómica se convierte en una disciplina fundamental en la era posgenómica que investiga las proteínas y cómo éstas otorgan a la célula su estructura y función.

Como se ha mencionado anteriormente, el genoma humano tiene aproximadamente 40,000 genes, los cuales pueden determinar un número mayor de proteínas diferentes, sin embargo una célula especializada, sólo expresa un número relativamente bajo de proteínas diferentes durante diversas etapas

TABLA 1. Análisis de la función génica. (Modificado de Oliver, S., 2000)		
NIVEL DE ANÁLISIS	DEFINICIÓN	MÉTODOS DE ANÁLISIS
Genoma	Total de información genética contenida en el ADN de un organismo incluyendo el de sus organelos	Secuenciación sistemática de ADN
Transcriptoma	Conjunto completo de moléculas de ARNm presentes en una célula, tejido u órgano	<ul style="list-style-type: none"> •Matrices de hibridación •SAGE (análisis serial de la expresión génica) •Northern blot de alta dispersión
Proteomas	Grupo completo de moléculas proteicas presentes en una célula, órgano o tejido	<ul style="list-style-type: none"> •Electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida •Espectrofotometría de masas •Sistema de hibridación en levaduras

de su vida. Un primer desafío de la proteómica es establecer los perfiles de expresión génica que consiste en saber qué genes se están expresando en una célula particular, en cada momento y en qué cantidad; sus variaciones normales y sus variaciones en estados patológicos. Un segundo objetivo, no menos fácil, es el de reconocer las vías y circuitos que las células usan para enviar mensajes de las membranas al núcleo o viceversa. Estas vías de comunicación se dan como respuesta a factores ambientales e implican relaciones proteínas-proteínas y proteínas-ADN que se establecen como conse-

cuencias de modificaciones químicas.

Existen diversas tecnologías de las cuales los investigadores se pueden valer para poder identificar y comparar las proteínas que se están expresando en una célula, en un momento dado (Tabla 1). Las más utilizadas en la actualidad son las técnicas de electroforesis bidimensional de proteínas en geles de poliacrilamida y la espectrofotometría de masas y en la actualidad se están desarrollando sistemas complejos de análisis de proteínas basados en biochips, robótica y bioinformática (Persidis, 1998), sin embargo se piensa que pasarán algunos años antes de que estos sistemas de análisis estén a punto (Dalton y Abbott, 1999).

Para análisis de proteomas, normalmente se utiliza una electroforesis en dos dimensiones y una posterior caracterización de la proteína (Quadroni y James, 1999; Cash, 2000). Este procedimiento consiste básicamente en la separación de las proteínas y subsiguiente identificación. Para llevar a cabo el primer paso se extraen mezclas complejas de proteínas de un tejido determinado y se corren mediante la utilización de una electroforesis bidimensional que permite separar las proteínas de acuerdo a su masa molecular y su carga isoeléctrica. De esta forma pueden separarse entre dos mil y 11 mil proteínas diferentes, de acuerdo a la calidad de los geles. Posteriormente son teñidos con colorantes y puestos de manifiesto sobre el gel, como puntos teñidos de acuerdo a la cantidad de proteína que se encuentre en la muestra.

Luego estos puntos son tomados del gel y cuantificados por métodos como la espectrofotometría o técnicas de radiografía.

Una vez separadas, extraídas y cuantificadas, las proteínas son digeridas por medios enzimáticos para obtener pequeños fragmentos proteicos que son colocados en un espectrofotómetro de masas que determina el valor exacto de su masa molecular. El número y orden de aminoácidos que forman estos fragmentos pueden ser determinados por medios tradicionales de los cuales el más utilizado es el método de Edman.

Estos métodos presentan la desventaja de no poder determinar todas las proteínas que pudieran estar disponibles en la muestra, ya sea por sus propiedades químicas o porque debido a su alta concentración no se separan como puntos definidos. Asimismo, las cuantificaciones no alcanzan a detectar cantidades menores a 1 nanogramo, lo que limita un análisis detallado.

El estudio de estas proteínas contribuye de manera importante al entendimiento de las funciones de los genes. Los proteomas pueden ser divididos en tres grandes áreas. 1) Microcaracterización de proteínas para su identificación 2) Visualización diferencial de diferentes proteínas en niveles de proteínas plasmáticas o fluidos biológicos con potencial de aplicación en un amplio abanico de enfermedades y 3) Estudios de interacciones proteína-proteína usando técnicas tales como la espectrofotometría de masas o el sistema de hibridación de levaduras. Debido a que frecuentemente es muy difícil el predecir la función de una proteína basándose en su homología con

otras proteínas o incluso basándose en su estructura tridimensional, la determinación de los componentes de un complejo proteico o de la estructura celular es una de las finalidades de este tipo de análisis. En este aspecto, el estudio de los proteomas es quizás el área que mayores esperanzas proporciona.

Para que el análisis del proteoma comience a ser útil y complementario para el análisis global del ARN mensajero, se necesita un gran crecimiento en la rapidez y reproducibilidad del aislamiento e identificación de las proteínas. Por ello, la simplificación y estandarización basada en la innovación de los sistemas de hardware y software, son condiciones necesarias para crear sistemas automáticos o "kits" que sean rápidos y fiables y permitan a muchos más laboratorios el acceder a esta técnica (Quadroni y James, 1999).

Otro de los problemas que aparecen en la interpretación de los resultados es la heterogeneidad de la naturaleza de los tejidos. Por esa razón, algunos autores proponen la utilización de la microdissección mediante un haz de láser. La recuperación de las células se consigue por activación de una película puesta en contacto con el tejido y se aplica el haz de láser en el área seleccionada ayudándose de un microscopio invertido. El área blanca de película seleccionada para el láser se une al tejido que se encuentra situado bajo ella y de este modo las células quedan libres posteriormente del tejido circundante. Este tipo de microdissección se utiliza en combinación con la electroforesis de dos dimensiones para el estudio del perfil de proteínas de tipo o área de tejido concreto.

Se ha mostrado la compatibilidad en la utilización de estas técnicas y el posterior análisis de ácidos nucleicos, aunque se tiene poca información acerca de las posibles interferencias con el análisis subsiguiente de proteínas. Por ello, aunque esta técnica se percibe como de gran utilidad para el futuro, son necesarios más estudios para su validación (Banks y col., 1999).

Los avances en la secuenciación del ADN y la disponibilidad de secuencias completas de varios organismos relevantes para la industria farmacéutica generan unas altas perspectivas en el estudio de los proteomas. Durante los próximos años los genomas y proteomas tendrán un gran impacto en las fases clínicas y en el desarrollo de fármacos. Los beneficios esperados son verificar estudios en el hombre, mejorar el aprovechamiento de los ensayos clínicos a través de la disponibilidad de marcadores relevantes desde el punto de vista biológico para la eficacia de fármacos y su seguridad (Steiner y Witzmann, 2000).

Dentro del campo de la microbiología, se están realizando diferentes estudios con organismos de los cuales se conoce su genoma. Tal es el caso de los estudios de Nilsson y col. (2000) llevados a cabo con *Helicobacter pylori*. Este organismo se fija a carbohidratos complejos presentes en la superficie de las mucosas y otros tejidos del hospedador mediante moléculas adhesivas (adhesinas) de la superficie celular del microbio. Estas adhesinas y otras proteínas asociadas a la membrana son de especial importancia para la generación de vacunas.

La identificación y caracterización de las proteínas de la superficie celular que aparecen en el *Helicobacter pylori* es un

requisito para generar y desarrollar vacunas destinadas a interferir con la colonización bacteriana de los tejidos del hospedador. Similares estudios apuntan en la misma dirección destacando la importancia de las adhesinas (generalmente interacción proteínas e hidratos de carbono complejos) en la mayoría de los casos conocidos para la colonización e infección (Larsson y col., 2000). En todos estos casos, el conocimiento de los productos de estos genes ha jugado un papel muy importante en el área médica y en la taxonómica (Cash, 2000).

Otra de las grandes áreas en las cuales están teniendo una gran importancia los conocimientos de los proteomas es en el caso de las enfermedades oncológicas. Los estudios de la expresión global de proteínas (proteoma) en células tumorales humanas han permitido la identificación de varios polipéptidos marcadores que pueden ser usados como herramientas muy apreciadas en el diagnóstico clínico de tumores. Muchos cambios que aparecen en la expresión genética grabada y que implica a tumores benignos y malignos son debidos a errores o cambios postransduccionales que no pueden ser detectados en análisis de ARN. Por ello, el análisis del proteoma contribuye en gran medida a obtener más información acerca de la variedad y grado de relación entre los tumores primarios y sus metástasis (Alaiya y col., 2000).

El análisis de los productos de la expresión génica también está siendo aplicado en el estudio de desórdenes del sistema nervioso central. El líquido cefalorraquídeo (LCFR) y el suero puede ser analizado para diagnóstico y seguimiento de ciertas enfermedades nerviosas. Los cambios en la composición de los patrones de proteínas en el LCFR pueden indicar alteraciones en el SNC (Rohlf, 2000).

Una de las formas utilizadas para este fin, es generar anticuerpos específicos para el análisis de proteínas. Este tipo de técnicas son utilizadas en la inmunolocalización de proteínas de nivel celular y subcelular (Larson y col., 2000). En la actualidad, los procedimientos para el análisis de este tipo de proteínas está enfocado mayormente en técnicas de espectrofotometría de masas. Esto supone un problema, ya que la optimización y entendimiento de la técnica es muy cara y consume mucho tiempo y debido a ello no se le ha puesto mucha atención (Locke y Figeys, 2000).

Debido a todo lo anteriormente citado, podemos observar que el interés mostrado a nivel científico ya empieza a plasmarse a nivel comercial, ya que existen numerosas compañías (Scale Biology Corp y Oxford GlycoSciences, Pfizer) que muestran un gran interés en desarrollar estos kits y organismos como el National Institute of Mental Health que buscan aplicar estos conocimientos en los estudios de Alzheimer. También debido a que son muchas las proteínas o productos de expresión de los genes, se sugiere que no sólo las grandes compañías trabajarán en ello, sino que pequeños grupos de investigación deben de colaborar en el gran camino que queda por delante. En nuestra opinión, todavía se deben de realizar muchos análisis y ensayos que nos ayuden a aclarar más nuestro conocimiento acerca de la Genómica y de la Proteómica.

REFERENCIAS

- Autor no identificado. (1999). "Proteomics, Transcriptomics; Whats in a name? Coments". *Nature* 1999 Dec. 16;402-(6763):715
- Alaiya, A. A., Franzen, B., Auer, G. y Linder, S. (2000). "Cancer proteomics: From identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification". *Electrophoresis*, (6), 1210-1217.
- Banks, R. E., Dunn, M. J., Forbes, M. A., Stanley, A., Pappin, D., Naven, T., Gough, M., Harnden, P. y Selby, P. J. (2000). "The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomics análisis: preliminary findings". *Electrophoresis*, (4-5), 689-700.
- Cash, P. (2000). "Proteomics in medical microbiology". *Electrophoresis*, 21, (6), 1187-1201.
- Cowley, A. W. (1998). "The emergency of physiological genomics". INABIS 98 5th Internet World Congress on Biomedical Sciences. Canada.
- Dalton, R y Abbott, A. (1999). "Can researchers find recipe for protein and chips". *Nature*. 402, 718-719.
- Larsson, T., Bergstrom, J., Nilsson, C. y Karlsson, K. A. (2000). "Use of an affinity proteomics approach for the identification of low-abundant bacterial adhesins as applied on the Lewis(b)-binding adhesin of *Helicobacter pylori*". *FEBS. Lett.*, 469, (2-3), 155-158.
- Martin, S. F., López C. G., y Maojo, G. V. (1999). "Impactos de la aplicación de las nuevas tecnologías para el tratamiento de la información genética en la investigación biomédica y en la práctica clínica". *Bioinformática y salud*, 19, enero-febrero.
- Nilsson, C. L., Larsson, T., Gustafsson, E., Karlsson, K. A. y Davidsson, P. (2000). "Identification of protein vaccine candidates from *Helicobacter pylori* using a preparative two-dimensional electrophoretic procedure and mass spectrometry". *Anal. Chem.*, 72, (9), 2148-2153.
- Oliver, S. (2000). "Proteomics: Guilt-by-association goes global". *Nature* 403, 601-603
- Pandey, A. y Mann, M. (2000). "Proteomics to study genes and genomes". *Nature*, 405 (6788), 837-846.
- Persidis, A. (1998). "Proteomics". *Nat. Biotechnol.* 16(4), 393.
- Quadroni, M. y James, P. (1999). "Proteomics and automation". *Electrophoresis*, (4-5), 664-677.
- Rohlf, C. (2000). *Electrophoresis*, (6), 1227-1234.
- Steiner, S. y Witzmann, F. A. (2000). "Proteomics: Applications and opportunities in premedical drug development". *Electrophoresis*, (11), 2099-2104.

EFFECTO TÓXICO DE LOS PLAGUICIDAS AGRÍCOLAS SOBRE LA RELAJACIÓN MUSCULAR.

Estudio de la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA)

Luis Fernando Plenge-Tellechea* y Javier Vargas-Medrano**

La Ca^{2+} -ATPasa (SERCA) es una proteína de membrana y por tanto, su actividad está modulada por los lípidos que la componen. Esta proteína es una enzima responsable de bombear Ca^{2+} del citosol de las fibras musculares hacia el interior del las cisternas del retículo sarcoplásmico (RS) a expensas de la hidrólisis de ATP, desencadenando con ello el fenómeno de la relajación del músculo. La sencillez de las membranas del retículo sarcoplásmico hacen que la Ca^{2+} -ATPasa sea un modelo útil y atractivo para estudiar las interacciones de compuestos fisiológicamente activos y poder evaluar el daño causado por los plaguicidas sobre la homeostasis celular del Ca^{2+} en músculo. El diseño experimental se llevará a cabo sobre vesículas aisladas del retículo sarcoplásmico de fibras musculares enriquecidas con la Ca^{2+} -ATPasa. Este tipo de estudios contribuirían al conocimiento de las interacciones moleculares de los plaguicidas usados comúnmente sobre la región y a mejorar los manejos bioquímicos usados en el sector salud contra las intoxicaciones sobre la población ocupacionalmente expuesta o accidental.

INTRODUCCIÓN

Hacia el sudoeste de Ciudad Juárez se encuentra localizado el Valle Agrícola de Juárez, donde por años se han aplicado plaguicidas de distintos tipos para incrementar la producción de las cosechas (Santana-Contreras, 1999). Esta práctica mediante un mal manejo puede provocar que este tipo de compuestos causen intoxicación al usuario o a otras personas de forma accidental.

Hay datos clínicos publicados de otras regiones que confirman la intoxicación accidental de niños por inhalación e ingestión de los plaguicidas usados en el campo o almacenados en el hogar (Lifshits y col., 1999).

Se ha observado que las comunidades rurales son regiones de uso intensivo de plaguicidas. Por ejemplo, un estudio reciente de la Universidad de Arizona demuestra que niños de 4 a 5 años de poblaciones rurales del Valle del Yaqui, Sonora, son expuestos de manera crónica y múltiple a plaguicidas, además documenta afectaciones neurológicas en su desarrollo y crecimiento (Guillete, 1998).

Daños en la salud

Muchos de los plaguicidas producen intoxicaciones, a veces

mortales en el ser humano. Como existen diferentes clases, algunos producen efectos a largo plazo, pueden llegar a causar enfermedades serias y hasta cáncer. Uno de los plaguicidas que causa mayores problemas en la salud es el llamado *paraquat* conocido como Gramoxone, es de alta toxicidad que puede causar intoxicaciones severas y en muchos casos mortales, y la persona puede intoxicarse con sólo respirarlo o al tener contacto con la piel. La ingestión es mortal. El *paraquat* puede causar serios daños en los pulmones, riñones, cerebro, hígado e incluso uno de los problemas más serios es que puede liberarse y penetrar hacia las plantas y aguas contaminando también los suelos.

Existen dos tipos de toxicidad: aguda y crónica, una toxicidad aguda es cuando el efecto es inmediato, por ejemplo una persona está aplicando el plaguicida por primera vez y se descompone, este es un efecto inmediato. La intoxicación crónica se refiere cuando un trabajador ha estado expuesto en forma repetida a los plaguicidas por algún tiempo, puede aparecer con síntomas importantes o malestares que son ocasionados por una intoxicación crónica.

La utilización de los productos fitosanitarios en la agricultura representa un beneficio innegable, garantizando una mayor producción agrícola y haciendo que la misma sea mucho

* Profesor-investigador del Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, Chihuahua, México, C. P. 32300. E mail: fplenge@uacj.mx.

** Estudiante del Programa de Biología, UACJ.

ABREVIATURAS: Ca^{2+} -ATPasa, Bomba transportadora de calcio; RS, retículo sarcoplásmico; SERCA, familia de proteínas transportadoras de calcio de RS; ATP, trifosfato de adenosina.

más estable. Sin embargo, la aplicación de estos insumos provoca riesgos tóxicos para la salud ya sea en forma accidental o por un manejo inapropiado de los mismos. Una intoxicación aguda, como consecuencia de la absorción de una cantidad excesiva de un producto fitosanitario en un corto intervalo de tiempo, puede producirse en forma intencional, accidental o por ignorancia en su empleo. Las vías de entrada de estas sustancias en el cuerpo humano pueden ser distintas, pero a nivel rural se considera el orden de importancia siguiente: 1) la cutánea; 2) la inhalatoria y 3) la oral, de menor contingencia (Berman y col., 1995).

Según datos de la Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes, el Servicio de Información Toxicológica (SINTOX), el inicio y la intensidad de los síntomas varía dependiendo del compuesto (inhibidor directo/indirecto), la ruta y el nivel de exposición. Los primeros síntomas son usualmente náusea, cefalea, fatiga, vértigo, visión borrosa, muchas veces descrita "como un velo sobre los ojos", y constricción pupilar. Dependiendo de la severidad de la intoxicación, estos síntomas pueden agravarse agregándose vómito, dolor abdominal y diarrea. El empeoramiento progresivo se caracteriza por espasmos musculares que usualmente inician en la lengua y los párpados, progresando a crisis convulsivas y finalmente parálisis. También hay broncoconstricción e hipersecreción bronquial y en la etapa final se observa parálisis, convulsiones, depresión respiratoria y coma.

La causa inmediata de muerte por la intoxicación fatal por organofosforados generalmente es la asfixia como resultado de una depresión respiratoria. (<http://www.mipediatra.com.mx/pediatras/organofosforados.htm>, 2000). También proporcionan datos que confirman una afección muscular, mas aún no se conoce con certeza la causa de la afección por el plaguicida, sólo su sintomatología.

Un problema referente a la sintomatología de los plaguicidas sobre el individuo afectado, es que no se conocen muchos de los procesos bioquímicos involucrados en el proceso de intoxicación. La mayoría de los datos han sido llevado a cabo sobre el sistema nervioso, concretamente sobre la enzima acetilcolinesterasa, pero como se mencionó anteriormente, se observa claramente que hay también una afección del sistema muscular.

La SINTOX de México también expone que la mayoría de los plaguicidas como los organofosforados, presentan su ruta de entrada principal por medio de la exposición dermal y la subsecuente absorción a través de la piel intacta en caso de exposición ocupacional. La ruta oral es importante en caso de ingestión accidental o con fines suicidas. La ingestión ocupacional accidental ocurre como resultado de un deficiente adiestramiento en el trabajo y la falta de higiene personal. La ruta respiratoria es generalmente la menos importante. La inhalación de organofosforados depende de la volatilidad del compuesto, del tipo de formulación y de la técnica de aplicación.

DATOS DE TOXICIDAD CRÓNICA

La exposición a altas concentraciones de organofosforado o por un periodo prolongado, puede originar cuadros clínicos que persisten por varios meses e incluyen alteraciones de las funciones cognoscitivas neuroconductuales y de la función neuromuscular. Así, se han reconocido algunos síndromes asociados con la exposición crónica, figurando como principales los siguientes:

1. *Lesión neuropsicopatológica retardada.* Puede manifestarse por fatiga crónica, cefalea, disminución en la libido, intolerancia al alcohol y nicotina e impresión de envejecimiento precoz, o presencia de síncope, defecto de memoria y demencia, datos que pueden persistir hasta 10 años después.

2. *Síndrome intermedio.* Incluye debilidad muscular, afección de músculos inervados por nervios craneales (músculos de la respiración y flexores cervicales) y alto riesgo de muerte por problemas respiratorios.

3. *Síndrome de neurotoxicidad retardada.* Se caracteriza por flacidez inicial, debilidad muscular de extremidades, seguida por espasticidad, hipertonicidad.

En los puntos dos y tres podemos observar la afección muscular, donde pueden estar involucrados los procesos de homeostasis celular del Ca^{2+} , concretamente sobre el proceso del transporte del ión.

Ciertos piretroides como las cipermetrinas causan síntomas de envenenamiento que incluyen: sensaciones faciales anormales, mareo, dolor de cabeza, náusea, anorexia y fatiga, vómito y secreción estomacal incrementada. La cipermetrina es también un irritante para la piel y los ojos. Por lo regular, los síntomas deberán aparecer después de algunos días, pero los pacientes severamente expuestos pueden sufrir además estirones musculares y ataques convulsivos. En tales casos, los síntomas pueden persistir por varias semanas (*Pesticides News*, 1995).

PARTICIPACIÓN DEL Ca^{2+} COMO SEGUNDO MENSAJERO. EFECTO SOBRE LA RELAJACIÓN DEL MÚSCULO: INTERVENCIÓN DE LA Ca^{2+} -ATPASA

El ión Ca^{2+} es uno de los segundos mensajeros más universales que participan en la transducción de señales bioquímicas (Tsien y Tsien, 1990; Berridge, 1993; Pozan y col., 1994).

La Ca^{2+} -ATPasa es una proteína integral de membrana y constituye alrededor del 65-80% del total de las proteínas del retículo sarcoplásmico caso de fibras musculares con una masa aproximada de 110 KDa. Estructuralmente se caracteriza por tres subunidades: una cabeza hidrofílica que sobresale al citoplasma donde se encuentra el dominio de unión de ATP y el de fosforilación, un tallo localizado en la superficie de la membrana en la cara citoplasmática y una tercera región intramembranal donde se localiza el canal de Ca^{2+} a través de la membrana.

La Ca^{2+} -ATPasa de RS transporta dos iones Ca^{2+} al interior del retículo por cada molécula de ATP hidrolizado. Este proceso conlleva la realización de cuatro etapas básicas: 1)

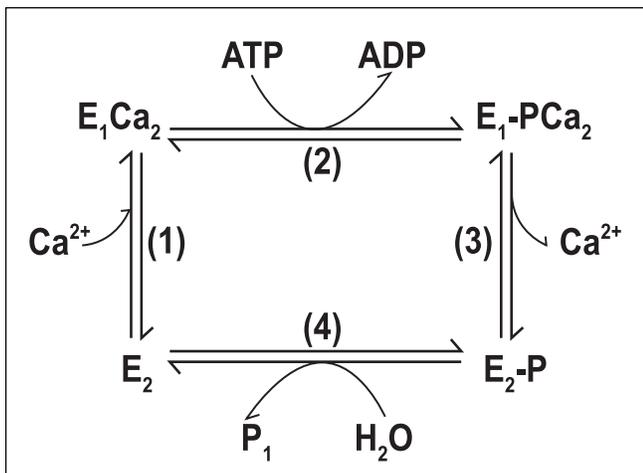


FIGURA 1. Ciclo catalítico de la Ca^{2+} -ATPasa de RS

unión de Ca^{2+} , 2) intermedio fosforilado (EP), 3) transporte del Ca^{2+} hacia el interior del retículo y 4) desfosforilación de la enzima (Figura).

Una característica habitual en la transducción de señales es que la síntesis y degradación de mensajeros estén controladas por sistemas enzimáticos. Esto permite a la célula poder ajustar de forma precisa y en cada momento los niveles de mensajero que necesita. El control de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma de las células se lleva a cabo a través de un complejo dispositivo de moléculas que se encargan de su unión y transporte.

El nivel de Ca^{2+} libre en el citoplasma en estado de reposo, es de aproximadamente 100 nm, mientras que en el medio extracelular alcanza un valor próximo a 2 mM. El Ca^{2+} libre en el citoplasma es un parámetro crítico, ya que la célula no puede subsistir en ausencia de Ca^{2+} , pero tampoco admite la presencia prolongada de concentraciones altas porque ello desencadena el proceso de apoptosis (Lam y col., 1994).

El Ca^{2+} puede unirse fuerte y selectivamente a proteínas debido a su capacidad de coordinación con átomos de oxígeno de cadenas laterales de Glu, Asp, Gln y asn (Kretsinger, 1980). Esto le permite conectar segmentos de la estructura de una proteína e inducir cambios conformacionales de gran magnitud. Los centros de unión de Ca^{2+} en las proteínas no son todos iguales (McPhalen y col., 1991) y por tanto no es posible predecir de forma general la presencia de estos centros mediante el análisis de la estructura primaria.

MÚSCULO ESQUELÉTICO Y CONTRACCIÓN MUSCULAR

Un aumento en la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma puede actuar como señal de transducción cuando el aumento se produce de forma transitoria. La especialización funcional del músculo y la participación del Ca^{2+} en el mecanismo de la contracción, hacen del tejido muscular un sistema adecuado para el estudio del control intracelular de Ca^{2+} .

El músculo esquelético está compuesto por células cilín-

dricas multinucleadas de 1-40 mm de longitud y hasta 0.1 mm de diámetro llamadas fibras musculares que se agrupan formando haces alargados (fascículos). Estas células se encuentran en estrecho contacto con las denominadas células satélite en respuesta a un estímulo adecuado (factor de crecimiento de fibroblastos o daño en el tejido muscular). Cada fibra muscular está envuelta por membrana plasmática conocida como sarcolema, la cual se excita ante señales eléctricas. El citoplasma (sarcolema) contiene haces de filamentos paralelos muy empaquetados que se denominan miofibrillas, que a su vez, están formadas por unidades contráctiles, denominadas sarcómeros, que se componen de filamentos gruesos de la proteína fibrosa miosina y filamentos finos de actina, troponina y tropomiosina. El deslizamiento de unos filamentos sobre otros produce el acortamiento de los sarcómeros y da lugar a la contracción del músculo.

La contracción sincrónica de los sarcómeros se origina gracias al sistema de túbulos transversos (Túbulos T), los cuales son invaginaciones del sarcolema y por tanto, sensibles a señal eléctrica. Junto a los túbulos T hay otro extenso sistema de membranas denominado retículo sarcoplásmico (RS) que se ramifica por encima de las miofibrillas. El RS posee en lo extenso de su membrana cantidades suficientes de la enzima Ca^{2+} -ATPasa con la finalidad última de bombear el Ca^{2+} citosólico hacia el lumen del RS a expensas de la hidrólisis de ATP y la consecuente relajación de los músculos (Plenge-Tellechea, 1998).

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, cualquier sustancia ajena al organismo que tenga posibilidades de interactuar con esta proteína podría desencadenar una alteración en la homeostasis intracelular del calcio (Lam y col., 1994) y como consecuencia una alteración en el fenómeno de la relajación.

EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS SOBRE LA HOMEOSTASIS CELULAR

Estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que los plaguicidas producen graves alteraciones fisiológicas en mamíferos (Gordon y Grantham, 1999) como la alteración de la temperatura a consecuencia de un aumento de la actividad metabólica relacionada con un mayor consumo de oxígeno. También se ha descubierto que afectan el fenómeno de la respiración mitocondrial (Palmeira y col., 1994; Ferreira y col., 1997).

Estudios realizados *in vitro* por medio de microsomas de células hepáticas de ratas (Yamaro y Morita, 1992; Palmeira y col., 1994). Los cuales indican un aumento del metabolismo relacionado con la incubación de los microsomas hepáticos en presencia de los plaguicidas triclorfon y diclorvos. Los resultados mostraron que los efectos de estos plaguicidas aumentaron con la adición de oxígeno. Concluyendo que la hepatotoxicidad está relacionada con su propiedad peroxidativa, la que se acelera por oxígeno. Los plaguicidas son capaces de producir trastornos neurológicos alterando los tejidos, inclu-

so produciendo graves daños (Antúnez y Madeira, 1982; Husain y col., 1996), cardiovasculares (Annand y col., 1995), también en las bombas de Na^+ y K^+ (Husain y col., 1996; Rahman y col., 1997) y de Ca^{2+} de distintos tipos de tejidos entre los que se encuentran el cerebro (Sahib y col., 1987; Mehrotra y col., 1989) y de eritrocitos (Janick y Wolf, 1992). Dichas alteraciones se relacionan con la afección directa sobre las proteínas situadas en sistemas membranosos, pudiendo ocasionar la muerte del organismo. Estos compuestos de origen hidrofóbico inciden directamente sobre las regiones no polares de las proteínas modificando su funcionalidad. Estos mecanismos de acción no son del todo entendidos (Antúnez y Madeira, 1994). El mecanismo de acción de cada plaguicida no es el mismo en todos los casos, esta variación se da según la estructura del plaguicida y el tipo de tejido. Muchos de estos estudios se han llevado a cabo en modelos *in vitro* por medio del manejo de extractos subcelulares y de preparaciones de membranas artificiales.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PLAGUICIDAS SOBRE SERCA

El mecanismo bioquímico de los plaguicidas no es el mismo en todos los casos. Sin embargo, estas moléculas son generalmente lipofílicas, como es el caso de organofosforados, organoclorados, piretroides, y herbicidas como el 2-4D, por lo que se deduce que su acción es sobre las biomembranas celulares, induciendo así cambios en su estructura nativa, los cuales a su vez producen alteraciones en los mecanismos de acción de las proteínas asociadas a éstas. Pero los estudios relacionados con las proteínas que intervienen en el fenómeno de la relajación y contracción del músculo no son suficientes. Por tanto, el estudio de la interacción de estas moléculas sobre las membranas celulares es de gran interés para esclarecer los mecanismos de acción de los plaguicidas. Las diversas alteraciones por plaguicidas en SERCA están relacionadas con la etapa de transporte del Ca^{2+} y la hidrólisis de ATP debido a la incidencia de estos componentes sobre las membranas y las regiones hidrofóbicas de la ATPasa, lo cual incide sobre el canal transportador de Ca^{2+} que se localiza justo en los segmentos transmembrana, causando inhibición o estimulación de la actividad enzimática, aún no está esclarecido del todo dicho fenómeno. Los datos aportados por Antúnez-Madeira y col. (1994) sugieren que los organofosforados actúan desestabilizando la organización de las membranas, ello en modelos sistemáticos utilizando liposomas de fosfatidilcolina.

Algunas de las técnicas de estudio más comunes sobre SERCA *in vitro* serían las siguientes: Aislamiento de membranas cerradas enriquecidas de retículo sarcoplásmico por medio de ultracentrifugación diferencial, evaluación del calcio transportado que nos ayuda a conocer de forma indirecta el proceso de actividad de la enzima y de la afectación de los mecanismos

de unión y transporte del catión, que puede utilizar distintas técnicas según se tengan a la mano como el uso de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, un electrodo sensible a Ca^{2+} conectado a un ión potenciómetro, medida de la actividad ATPasa por medio de reactivos colorimétricos donde se evalúe el P_i liberado como fruto de la hidrólisis del ATP, lo cual nos proporcionaría datos sobre la actividad funcional de la enzima y su fosforilación. Cabe mencionar la evaluación de los efectos a cambios de pH y temperaturas durante los experimentos. Todas estas técnicas entre un sinnúmero de ellas nos ayudarían a evaluar los daños a la ATPasa y por consiguiente el fenómeno de la relajación de los músculos esqueléticos, que podría conllevar desde a fenómenos de parálisis y convulsiones hasta la muerte, según el grado de toxicidad del plaguicida.

REFERENCIAS

- Antúnez-Madeira, M. C. y Madeira, V. M. C. (1982). "Interaction of insecticides with Ca^{2+} -Pump activity of sarcoplasmic reticulum". *Pesticid. Physiol.* 17, 185-190.
- Antúnez-Madeira, M. C., Videira, R. A. y Madeira, V. M. C. (1994). "Effects of parathion on membrane organization and implications for the mechanisms of toxicity". *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 149-154.
- Berman, J. M., Fenner, J. e Indelicato, L. (1995). CASAFE. <http://www.casafe.org/manual/emergenc.html>
- Berridge, M. J. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling". *Nature* 361, 315-325.
- DeJesus, F., Girardet, J. L. y Dupont, Y. (1993). «Characterization of ATP binding inhibition to the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by thapsigargin» *FEBS Lett.* 332, 229-232.
- Ferreira, F. M. Madeira. V. M. y Moreno, A. J. (1997). "Interactions of 2,2-bis(prochlorophenyl) 1,1-dichloroethylene with mitochondrial oxidative phosphorylation". *Biochem. Pharmacol.* 53, 299-308.
- Gordon, C. J. y Grantham, T. A. (1999). "Effect of central and peripheral cholinergic antagonists on chlorpyrifos-induced changes in body temperature in the rat". *Toxicology* 142, 15-28.
- Guillete, E. (1998). "An Antropological Approach to the Evaluation of Preschool Children exposed to pesticides in Mexico", *an Environmental Health Perspectives.* 106.
- Husain, R., Adhami, V. M. y Seth, P. K. (1996). "Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adults rats". *J. Toxicol. Environ. Health* 48, 515-526.

- Janik, F. y Wolf, H. U. (1992). "The Ca²⁺-transport-ATPase of human erythrocytes as an in vitro toxicity test system-acute effects of some chlorinated compounds". *J. Appl. Toxicol.*, 351-358.
- Kretsinger, R. H. (1980). "Structure and evolution of calcium modulated proteins". *CRC. Crit. Rev. Biochem.* 8, 119-174.
- Lam, M., Dubyak, G. Chen, L., Núñez, G., Miesfeld, R. L. y Distelhorst, C. W. (1994). "Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum associated Ca²⁺ fluxes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6569-6573.
- Mehrotra, B. D., Moorthy, K. S., Reddy, S. R. y Desai, D. (1989). "Effects of cyclodine compounds on calcium pump activity in rat brain and Herat". *Toxicology* 54, 19-29.
- Mipediatra (2000). <http://www.mipediatra.com.mx/pediatras/organofosforados.htm>
- Palmeira, C. M., Moreno, A. J. y Madeira, V. M. (1994). "Interactions of herbicides 2, 4-D and dinised with liver mitochondrial bioenergetics". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 50-57.
- Pesticides News* (1995). #30, Dec. London, 20-21.
- Pick, U, y Bassilian, S. (1981). "Modification of the ATP binding site of the Ca²⁺-ATPase from the sarcoplasmic reticulum by fluorecein isothiocyanate". *FEBS Lett.* 123, 127-136.
- Plenge-Tellechea, L. F. (1998). "Mecanismos moleculares de inhibición de ATPasas transportadoras de Ca²⁺". Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España. 230 pp.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. y Medolesi, J. (1994). "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores". *Physiol. Rev.* 74, 595-636.
- Rahman, M. F., Siddiqui, M. K. y Mustafa, M. (1997). "Effects of a new phosphorothionate (RPR-V) on ATPase and acetylcholinesterase in rat brain by subchronic dosing". *J. Appl. Toxicol.* 17, 273-278.
- Sahib, I. K., Prasada-Rao, K. S. y Desai, D. (1987). "Pyrethroid inhibition of basal and calmodulin stimulated Ca²⁺-ATPase and adenylate cyclase in rat brain". *J. Appl. Toxicol.* 7, 75-80.
- Santana-Contreras, L. E. (1999). "Manual para el análisis de plaguicidas organoclorados en agua potable por cromatografía de gases basado en experiencia profesional". Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. 136 pp.
- Tsien, R. W. y Tsien, R.Y. (1990). "Calcium channels, stores, and oscillations". *Annu. Rev. Cell. Bio.* 6, 715-760.
- Yamano, T. y Morita, S. (1992). "Hepatotoxicity of trichlorfon and dichlorvos isolated rat hepatocytes". *Toxicology* 76, 69-77.

Guidelines for authors

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

- 1) Papers should be from original research and with scientific content.
- 2) Once published, articles cannot be published elsewhere in the same form, in any language, without the consent of UACJ publishers.
- 3) Papers may be: research articles, short manuscripts and invited reviews, belonging to the fields of natural or exact sciences (biology, life sciences, chemistry, mathematics, physics, etc). Final decisions concerning acceptability of the manuscripts will be made by the Editorial Board.
- 4) Papers may be written in English, Spanish or any Romance language. If a translation to Spanish is submitted, the text in original language should also be provided.

Abstracts written both in Spanish and English should also be provided.

- 5) Originals are not sent back.
- 6) If the author fails to respond to the final comments of the Editorial Board of *Ciencia en la Frontera: Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ*, the journal can make editing changes which do not modify the original content of the article.

7) Papers should meet the following format:

- a) Short and concise title, written in both English and Spanish or Romance languages.
- b) A brief abstract between 40 and 150 words, which should also be written in both languages.
- c) Name and nationality of authors.
- d) Affiliation of authors, including highest degree and research field of all authors.
- e) Author affiliations should be included as footnotes starting from number 1.
Ex. Ramírez, J. L.¹ y Martínez, R.²
1 Universidad de Puebla, México.
2 Universidad de Santiago Compostela, España.
Footnotes should be posted at the bottom left side of the page where they are mentioned.
- f) Specify type of paper, i.e. Research article, Short manuscript or Invited Review.
- g) Postal address of the corresponding author, which includes: telephone, fax and e-mail. Corresponding author should be highlighted with an asterisk (*) mark.
- h) Manuscripts should be submitted in triplicate, printed in one side only, letter or A4 size paper, double-spaced, with margins of 3 cm.
- i) A disk copy of the manuscript in Win/Word 6.0 or higher, should also be provided. Figures and tables should be sent in Excel or WinWord 97, each saved in a different file.
- j) For Research articles, manuscript length should be between 10 and 30 pages, plus figures and tables. Short manuscripts should be shorter than 10 pages, plus figures and tables.

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

BOOK REFERENCES:

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

Ex:

Foucault, Michael (1984). "*Las palabras y las cosas*". México: Siglo XXI. 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 Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin". *J. Biol. Chem.*, 267, 12606-12613.

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

Normas de publicación para colaboradores

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

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

Ejem. Ramírez, J. L.¹ y Martínez, R.²

¹ Universidad de Puebla, México.

² Universidad de Santiago Compostela, España

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

- 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 Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin". *J. Biol. Chem.*, 267, 12606-12613.

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

Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ,
se terminó de imprimir en diciembre de 2003 en los talleres de la Imprenta
Universitaria, Hermanos Escobar y Plutarco Elías Calles,
Ciudad Juárez, Chih., México

Tiraje: 750 ejemplares



Ing. Rafael Vaquera
Jefe de Servicio de Imprenta

Sr. Juvenal Rodríguez
Jefe de taller

