

Irma Delia Enríquez Anchondo
(Coordinadora)

UACJ



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

DIRECTORIO

Ricardo Duarte Jáquez
Rector

David Ramírez Perea
Secretario General

Manuel Loera de la Rosa
Secretario Académico

Luis Enrique Gutiérrez Casas
*Coordinador General de
Investigación y Posgrado*

Daniel Constandse Cortez
Director del ICB

Ramón Chavira Chavira
*Director General de Difusión
Cultural y Divulgación Científica*

Jorge Alberto Pérez León
Coordinador Editorial

COMITÉ EDITORIAL DEL ICB

Daniel Constandse Cortez (*Presidente*)
Irma Delia Enríquez Anchondo (*Secretaria*)

Antonio de la Mora Covarrubias

Eduardo Pérez Eguía

Beatriz Aracely Díaz Torres

Salvador D. Nava Martínez

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS,
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la uacj / Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Coordinación General de Investigación y Posgrado. Vol. 14. (2016). Ciudad Juárez, Chih.: uacj, 2016. v.; 21 cm. Seriado.

Apoyado con Recursos PROFOCIES 2015

Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la uacj Volumen Especial, 2016, es una publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, a través del Instituto de Ciencias Biomédicas y de la Coordinación de Investigación y Posgrado del ICB y el Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Editor responsable: Jorge Alberto Pérez León. Reserva al uso exclusivo otorgada por INDAUTOR Núm. 04-2013-03221300-5400-102 y el ISSN 2007-042X. Copyright © UACJ. Esta obra se terminó de imprimir en noviembre de 2016 en los talleres de Imprenta Lazer, Avenida Pedro Rosales de León 6595, Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Tiraje: 500 ejemplares.

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 aceptan 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.

<http://www.uacj.mx/DGDCDC/SP/Paginas/CienciaenlaFrontera.aspx>

CONTENIDO

Prevalencia y componentes individuales asociados al síndrome metabólico en estudiantes universitarios

René Urquidez Romero	
Anabel Flores Acevedo	
Julián Esparza-Romero	
J. Rafael Jiménez Flores	
Itzell A. Gallardo-Ortiz	
A. René Méndez Cruz	
Santiago C. Sigríst Flores	
Diana C. Tapia Pancardo	
Miguel Murguía Romero	
Arnulfo Ramos Jiménez	
Rafael Villalobos Molina	11

Aspectos estructurales y mecanísticos de la enzima ureasa y sus proteínas accesorias

Luis Aguirre Reyes	
Miguel Armando Ramos Soto	
J. Aline Orozpe Olvera	
Ernesto Lucero Orozco	
Naun Lobo Galo	
Luis Fernando Plenge Tellechea	
José Valero Galván	
Emilio Álvarez Parrilla	
Alejandro Martínez Martínez	
Ángel Gabriel Díaz Sánchez.....	19

Las células ganglionares fotorreceptoras

María Magdalena Aldape Castro	
Leny Judith Álvarez Araujo	
Marisela Baylón Aguilar	
María Mayela de Lira Carrera	
Magaly María Escamilla Guerrero	
Jorge Alberto Pérez León	39

Detección de Streptococcus agalactiae a partir de aislamientos y muestras clínicas en mujeres embarazadas que acuden a los hospitales en Ciudad Juárez.

Jesús Ángel Araujo González	
David Reyes Ruvalcaba	
Nadia Hernández Urista.....	47

<i>Efectibilidad y factibilidad de los métodos de análisis de la composición de la dieta de venados</i> Martha Patricia Olivas Sánchez Cuauhcihuatl Vital García Juan Pedro Flores Márgez	57
<i>Eficiencia ectomicorrizógena en especies de pino de Chihuahua con el uso de Pisolithus tinctorius (scop)</i> Miroslava Quiñónez Martínez Ivonne Estela Aguilar Moreno Miguel Ángel Viveros Pinto Neida Aurora Martínez Escobedo Irma Delia Enríquez Anchondo Toutcha Lebgue Keleng Fortunato Garza Ocañas	65
<i>Respuesta agronómica y edáfica a la aplicación de biosólidos en el cultivo algodnero en el Valle de Juárez, Chihuahua</i> Juan Pedro Flores Márgez Baltazar Corral Díaz Pedro Osuna Ávila Ana Irene Flores Arras	75
<i>Preparación de un injerto traqueal a partir de una matriz biológica de cerdo</i> Elisa Barrera Ramírez Rubén E. Garrido Cardona Edna Rico Escobar Alejandro Martínez Martínez Luis Fernando Plenge Tellechea Alfredo Hernández Enrique Vanegas Venegas Rubén Rincón	89

ABSTRACTS

Prevalence and individual components associated with the metabolic syndrome in university students

René Urquidez Romero

Anabel Flores Acevedo

Julián Esparza-Romero

J. Rafael Jiménez Flores

Itzell A. Gallardo-Ortiz

A. René Méndez Cruz

Santiago C. Sigríst Flores

Diana C. Tapia Pancardo

Miguel Murguía Romero

Arnulfo Ramos Jiménez

Rafael Villalobos Molina..... 11

Mexico presents a public health problem that demands a prompt assistance for the control and prevention of diseases associated with metabolic syndrome (MetS). Objective. To know the early markers to identify the risk of developing MetS in university students. Methodology. Cross-sectional study in university students from Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (n=5535). MetS components were evaluated and the prevalence was determined by using the criteria of ATP-III 2001 and ALAD 2010. Results. The prevalence of MetS by ATP-III 2001 was 6.0% (5.3% in men vs. 6.4% in women). By ALAD 2010 was 8.8% (8.2% in men vs. 9.2% in women). Low HDL cholesterol and abdominal obesity were the most frequent individual factors. Conclusions. The presence of risk factors in student population increases the number of unhealthy individuals, favoring obesity and low HDL development, factors involved in the risk of MetS.

Key words: metabolic syndrome, risk factors, university students.

Structural and mechanistic aspects of the enzyme urease and its accessory proteins

Luis Aguirre Reyes

Miguel Armando Ramos Soto

J. Aline Orozpe Olvera

Ernesto Lucero Orozco

Naun Lobo Galo

Luis Fernando Plengue Tellechea

José Valero Galván

Emilio Álvarez Parrilla
 Alejandro Martínez Martínez
 Ángel Gabriel Díaz Sánchez.....19

Secondary infections resulting from medical procedures are a central problem in the health field, with a great economic and social impact and a challenge for the scientific community and medical staff. The mortality rate for these infections, called nosocomial infections, is high. It is currently accepted that the main microorganisms responsible for these infections are *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans*, among others less common. In addition to combating these infections the problem of multi-resistance to antibiotics is included, which these bacteria tend to acquire horizontally. Bacteria use virulence factors to produce the optimal conditions for the establishment and colonization of the tissues of their hosts. Some of these virulence factors are enzymes, whose catalytic activity provides them with a suitable environment for infection. The development of drugs that neutralize and inactivate virulence factors constitutes a potential point of antimicrobial control. Another strategy that has been used for the development of new treatments to combat infections is the use of specific inhibitors against enzymes whose activity is essential for the growth of bacteria. Urease activity is essential for the survival of pathogenic bacteria in the different environments present in different tissues. Urease is a metalloenzyme, which requires two important postranslational modifications which dependents on the hydrolysis of GTP. A carbamoylation on a lysine residue and the insertion of two nickel ions at the active site. This maturation is directed by a GTPase called UreG and other accessory proteins. The importance of these accessory proteins has been previously described in *K. aerogenes* and in *Helicobacter pylori*. Infections produced by pathogenic strains of *E. coli* have shown not only an increase, but a recurrence in patients with urogenic and gastrointestinal infections. Urease and its accessory proteins, such as UreG, are potential targets for antimicrobial control. However, the development of antibiotics first requires an understanding of their functioning to molecular details. In this manuscript we show some details of the function and structure of urease and its accessory proteins derived from structural studies combined with enzymatic kinetic experiments.

Photoreceptor ganglion cells
 María Magdalena Aldape Castro
 Leny Judith Álvarez Araujo
 Marisela Baylón Aguilar
 María Mayela de Lira Carrera
 Magaly María Escamilla Guerrero
 Jorge Alberto Pérez León39

The suprachiasmatic nuclei (SCN), allocated in the hypothalamus of mammalian encephalon, are responsible for maintaining circadian rhythms. These rhythms are sincronised to day-light cycle by environmental light information coming through the retinal input via the axons of retinal ganglion cells, a phenomenon called photoentrainment. Early studies in 1920's demonstrated that blindness do not preclude photoentrainment, even though it was a strict requirement the entire integrity of the eyeballs. During years an

accepted explanation consisted of a low number of rods and cones, certainly quite a few to form a nerve impulse conveying visual information, but still enough to transmit environmental radiance to set the circadian clock. However, in 1999 genetic manipulations showed that in the total absence of rods and cones, photoentrainment is still possible due to the action of a third class of photoreceptor cell. The convergent action of histologic, physiologic, genetic and behavioral studies brought to the scenario the role of a special group of ganglion cells which express the photopigment melanopsin making them a special set of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) which project directly to the SCN and are responsible of photoentrainment of the circadian rhythm and others functions not related to vision, grouped as non-visual functions of the retina. Here we summarize an account of the ipRGCs activities, features and involvement in certain cognitive functions related to circadian rythms.

Detection of Streptococcus agalactiae from isolates and clinical samples in pregnant women attending the hospitals in Ciudad Juárez

Jesús Angel Araujo González

David Reyes Ruvalcaba

Nadia Hernández Urista.....47

The beta hemolytic Streptococcus agalactiae group B (S. agalactiae) is a constituent of the native microbiota vagina, urethra, etc. This bacteria is known to cause infections in pregnant women and can be fatal to the newborn. Pregnant women can take asymptomatic, and transmit the organism to their children through the birth canal, there is a risk of causing pneumonia, sepsis or meningitis. Which have high mortality rate.

The Centers for Disease Control and Prevention (CDC for its acronym in English) of the United States, have implemented strategies based on population studies, recommending perform screenings for vaginal colonization by S. agalactiae by culture and / or molecular detection between week 35 and 37 of gestation; It prophylaxis followed, when required.

Mexico is a country that does not perform this screening. Statistics from other Latin American countries report significantly lower prevalence of bacterial colonization. It is therefore important to know our maternal prevalence statistics by S. agalactiae in Ciudad Juarez, to plan strategies to reduce neonatal morbidity and mortality in your case. This paper uses the tool of PCR (polymerase chain reaction) for detection. The aim is to recognize the importance of this method and in a timely implement in city hospitals for better diagnosis.

Key words: PCR, S. agalactiae, beta hemolysis, meningitis.

Effectiveness and feasibility of methods of analyzing the diet composition of deer

Martha Patricia Olivas Sánchez

Cuauhcihuatl Vital García

Juan Pedro Flores Márgez.....57

This review consisted of examining the different methods to determine the diate composition of deer. The amin was to compare the effectiveness and feasibility of the methods. It was found that there are six methodologies: 1) Observation in the field, 2) Microhistology, 3) Analysis of esophageal or rumen fistulation, 4) Analysis of stomach contents, 5) Use of linear alkanes in plant cuticles (waxes) and 6) Infrared spectroscopy. Out of all methods, microhistological analysis of feces is the most used becuase offers the advantage of the easy samples collection and practically unlimited amount of them, as well as the use of non-specialized equipment, also allows the determination of smaller taxa such as identification of species contained in the diet.

Mycorrhizal efficiency in pine species of Chihuahua with the use of Pisolithus Tinctorius (scop).

Miroslava Quiñónez Martínez

Ivonne Estela Aguilar Moreno

Miguel Ángel Viveros Pinto

Neida Aurora Martínez Escobedo

Irma Delia Enríquez Anchondo

Toutcha Lebgue Keleng

Fortunato Garza Ocañas 65

In Chihuahua a great diversity of ectomycorrhizal fungi (HEM) participating in the conservation of their forests, being associated with different pine species according to their capacity are part of the development of the plant develops. The aim of this study was to evaluate the ability ectomycorrhizal from fungal species in *Pinus arizonica* seedlings. Fruiting bodies of *Pisolithus tinctorius* were collected. Treatments of 10, 15 and 20 ml of spore suspension by injection into the substrate for each species of fungus in the pine seedlings were applied. 20 pine seedlings inoculated with fungus volume and 10 were used as a control. Evaluations were morphometric measures the pine plants, before and after inoculations a total of 240 plantlets were established pine. *Pinus arizonica* was recorded that showed significant differences between inoculated and uninoculated plants and between concentrations.

Agronomic and Edaphic Response to the Application of Biosolids in the Cultivation of Cotton in Valle de Juárez, Chihuahua

Juan Pedro Flores Márgez

Baltazar Corral Díaz

Pedro Osuna Ávila

Ana Irene Flores Arras 75

To promote natural recycling of sludges, reduce municipal landfill storage of biosolids, reduce agricultural production costs, and to improve soils fertility, where the reasons that impuled this research. The effect of biosolids on cotton agronomic response and soil properties at the Juarez Valley, Chihuahua, was determined in a commercial plot at Rancho Universitario UACJ. Cotton yield was not significantly

different between the soil treated with biosolids and the control with chemical fertilizer, but fiber quality as length and fineness increased with fertilizer application in control plot. The chlorophyll relative index, number of harvested plants, and height plants not varied significantly among soil treatments. Bolls formation and total number of fruits were not affected by treatments, but precocity in fruits was higher in the soil treated with biosolids. The economic analysis reflected a saving of \$3260 pesos in cotton production costs for the soil treated with biosolids. Physical properties of the soil were not modified significantly. Soil salinity and alkalinity were not modified with biosolids application at agronomic rate, however the concentration of nutrients as phosphorus and total nitrogen increased in soil.

Key words: sludges, soil, fiber, phosphorus, nitrogen.

Preparation of a biological matrix using porcine trachea

Elisa Barrera Ramírez

Rubén E. Garrido Cardona

Edna Rico Escobar

Alejandro Martínez Martínez

Luis Fernando Plenge Tellechea

Alfredo Hernández

Enrique Vanegas Venegas

Rubén Rincón89

Tissue engineering has made possible organ regeneration to better or substitute biological functions by using autologous cells and matrix. The objective of this project is to obtain a tracheal graft. Two methods for decellularization of tracheas were used, obtained from sacrificed pigs for other purposes; the matrixes were sterilized and stored at -800C until the process of regeneration. They were unfrozen and implanted in the omentum of the abdominal cavity of three Yorkshire pigs. Each animal received a different matrix. After 15 and 8 days tissue was obtained for evaluation. The matrixes showed different macroscopic characteristics compared to control, no significant differences were shown in the mechanical evaluation. The regenerated tissues showed evidence of revascularization, neoformation and mechanical alterations. All the animals survived the experiment. The graft was obtained using a biological matrix regenerating the tissue in the abdominal omentum as a simple, feasible and economic option. Mechanical alterations of the graft are probably due to a drastic decellurization treatment, cryopreservation or failure of shearing forces. In the next stage, the histological report will be analyzed and measures will be taken to modify the mechanical alterations of the regenerated tissues.

Key words: biological matrixes, tissue engineering, graft, trachea.



Prevalencia y componentes individuales asociados al síndrome metabólico en estudiantes universitarios

René Urquidez Romero^{1}*
Anabel Flores Acevedo¹
Julián Esparza-Romero²
J. Rafael Jiménez Flores³
Itzell A. Gallardo-Ortiz³
A. René Méndez Cruz³
Santiago C. Sigríst Flores³
Diana C. Tapia Pancardo⁴
Miguel Murguía Romero⁴
Arnulfo Ramos Jiménez¹
Rafael Villalobos Molina⁴

RESUMEN

Introducción

México presenta un problema de salud pública que demanda una pronta asistencia para el control y prevención de enfermedades asociadas al Síndrome Metabólico (SMet).

Objetivo

Conocer los marcadores tempranos para identificar el riesgo de desarrollar SMet en universitarios.

1 Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México

2 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A. C.), Hermosillo, Sonora, México.

3 Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

4 Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

* Correspondencia. Dr. René Urquidez Romero. Departamento de Ciencias de la Salud, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). Av. Plutarco Elías Calles #1210. Fovissste Chamizal. C.P. 32310. Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Cuerpo Académico de Nutrición Comunitaria. Coordinación de Nutrición, Enfermedades Crónico-Degenerativas. UACJ. Correo: rurquide@uacj.mx, (656) 6881835 LN. Anabel Flores Acevedo. Coordinación de Nutrición. UACJ. Correo: al103720@alumnos.uacj.mx, (656) 2133887.

Doctor Julián Esparza Romero. Unidad de Investigación en Diabetes, Departamento de Nutrición Pública y Salud, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A. C.), Hermosillo, Sonora, México. julian@ciad.mx, (662) 2907395.

Doctor J. Rafael Jiménez Flores, Síndrome Metabólico-Inmunología. División de Investigación y Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM Correo: jrjf@unam.mx, (55) 5623-1333, ext. 31220.

Doctora Itzell A. Gallardo Ortiz. Síndrome Metabólico-Bioquímica/Farmacología. (55) 5623-1333, ext. 39795.

Doctor A. René Méndez Cruz, Síndrome Metabólico-Inmunología. División de Investigación y Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM Correo: amendez@campus.iztacala.unam.mx, (55) 5623-1148.

M. en C. Santiago C. Sigríst Flores. División de Investigación y Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Correo: sigrist_fsc@hotmail.com. (55) 5623-1333, ext. 31220.

Doctora Diana C. Tapia Pancardo, Salud Pública. División de Investigación y Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

dianacecitapia@hotmail.com (55) 5623-1333, ext. 39795.

Doctor Miguel Murguía Romero, Síndrome Metabólico-Bioinformática. Correo: miguelmurguia@gmail.com (55) 5623-1333, ext. 39795.

Doctor Arnulfo Ramos Jiménez. Coordinación de Entrenamiento Deportivo, UACJ. Correo: aramos@uacj.mx, (656) 1679309.

Doctor Rafael Villalobos Molina, Síndrome Metabólico-Bioquímica/Farmacología. Correo: villalobos@campus.iztacala.unam.mx, (55) 5623-1333, ext. 39795.

Metodología

Estudio descriptivo transversal en universitarios de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM (n=5535). Se evaluaron los componentes del SMet y se determinó la prevalencia usando los criterios del ATP-III 2001 y ALAD 2010.

Resultados

La prevalencia de SMet por ATP-III 2001 fue 6.0% (5.3% en hombres *vs.* 6.4% en mujeres). Por ALAD 2010 fue de 8.8%, (8.2% en hombres *vs.* 9.2% en mujeres). HDL bajo y obesidad abdominal, fueron los factores individuales más frecuentes.

Conclusiones

La presencia de factores de riesgo en población estudiantil aumenta el número de individuos poco saludables, favoreciendo el desarrollo de obesidad y HDL bajo, factores implicados en el riesgo de padecer SMet.

Palabras clave: Síndrome metabólico, factores de riesgo, universitarios.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Metabólico (SMet) es un estado fisiopatológico caracterizado por resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensión arterial y obesidad abdominal (Alberti *et al.*, 2009). Los reportes indican que estos factores incrementan el riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 (DM2), enfermedades cardiovasculares y renales (Martínez *et al.*, 2005). El SMet afecta a una porción importante de la población mundial y ha alcanzado proporciones epidémicas en los países desarrollados, donde la prevalencia puede sobrepasar el 40% de los sujetos mayores de 40 años. En México, desde el año 2000, la DM2 y las enfermedades cardiovasculares (ECV) son las dos causas principales de muerte (ENSANUT 2012; Barquera, 2012). Al considerar estas cifras, los epidemiólogos utilizan el SMet para identificar sujetos de alto riesgo para desarrollar DM2 y complicaciones cardiovasculares.

La resistencia a la insulina es una causa esencial del SMet (Reaven, 2004). La historia natural del SMet se clasifica en tres estadios y algunas de las alteraciones se manifiestan varios años después de que ocurren en el individuo. Así, además de la información genética del individuo, hay una clara influencia de factores ambientales que parecen fa-

vorecer la expresión de los genes, lo que conlleva a las alteraciones en el metabolismo y las subsecuentes patologías.

Actualmente no existe un criterio estándar aceptado universalmente para el diagnóstico del SMet, de ahí que las prevalencias de este síndrome en una misma población y entre poblaciones varían significativamente dependiendo del criterio utilizado, lo cual dificulta la interpretación epidemiológica de los resultados al comparar entre poblaciones. Las organizaciones que han propuesto estos criterios son la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO) en 1998 y modificado en 1999; el Programa Nacional de Educación para el Colesterol, Panel de Tratamiento del Adulto (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, NCEP ATP-III 2001) y la Federación Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) en el 2009 y la más reciente, la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) en el 2010. (WHO, 1999; Grundy *et al.*, 2005; Alberti *et al.*, 2009; Rosas *et al.*, 2010).

El estudio de la salud en los adultos jóvenes, especialmente en estudiantes universitarios, en relación con los componentes del SMet es vital para disminuir el riesgo de desarrollo futuro de las enfermedades crónicas. Los estudiantes universitarios de primer año experimentan un aumento de peso más rápido que el adulto promedio, hasta 11 veces más rápido.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio es conocer la prevalencia y los marcadores antropométricos, bioquímicos y clínicos del SMet de acuerdo con los criterios del ATP-III 2001 y ALAD 2010 en estudiantes universitarios

METODOLOGÍA

Población y Diseño

Por medio de un estudio transversal analítico llevado a cabo en los años 2007 al 2012. Es una población de estudiantes universitarios de las diferentes licenciaturas impartidas en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México. El estudio consistió en tomar una muestra aleatoria de la población de primer ingreso, en el cual se hizo una medición de las predictivas.

La población total muestreada fue de 5535 estudiantes y corresponde a 1/3 de cada una de las 6 carreras de licenciatura (Biología, Cirujano Dentista, Enfermería, Médico Cirujano, Optometría y Psicología) que se imparten en la FES Iztacala.

El método empleado en este estudio consta de tres partes principales: una anamnesis, antropometría y, finalmente, una muestra sanguínea por cada individuo. Cada muestra se registró con el nombre del estudiante y un código de barras para facilitar su identificación.

La entrevista clínica consistió en obtener la mayor información posible acerca del paciente: nombre, edad, sexo, antecedentes familiares, antecedentes patológicos, antecedentes de historia de peso corporal, hábitos alimentarios y en general conocer más su estilo de vida.

Antes del estudio, ninguno de los estudiantes se percibió enfermo, y no tenían diagnóstico médico de alteraciones metabólicas.

Se solicitó a los estudiantes arribar a la universidad entre las 7 y las 10 a.m., después de un ayuno de 9 horas. La anamnesis se llevó a cabo por médicos especialistas en medicina interna, del Grupo Multidisciplinario de Investigación en Salud y Rendimiento Académico (GMISARA) de la FES Iztacala. Una vez establecida la relación con el estudiante, se procedió a tomar las medidas antropométricas, así como también se registró la presión arterial.

Se les determinó la circunferencia de la cintura con precisión de ± 0.1 cm al final de la respiración, con una cinta métrica flexible, no elástica. El sujeto estuvo de pie, erecto y con el abdomen relajado. Los brazos a los lados del cuerpo y los pies juntos. La persona que tomó la medición estuvo de frente al sujeto y colocó la cinta alrededor de este, en un plano horizontal al nivel de la parte más angosta del torso.

La presión arterial sistólica y la diastólica fueron obtenidas por varias mediciones (hasta 4), después de que el estudiante estuvo sentado y tranquilo por 5 minutos. Se usó un esfigmomanómetro aneroide estándar (modelo DS44 de WelchAllyn). Los valores máximos replicados de las presiones sistólica y diastólica se usaron como estimados de la presión sanguínea real.

La estatura se determinó con un estadiómetro (Seca modelo 206), y la masa corporal con una balanza (Bame Aut modelo O.C.N. 5282; Torrey, México). Por último, se tomó la muestra sanguínea de cada individuo para la determinación de glucosa, HDL-colesterol y triglicéridos, realizado por personal capacitado de Carpermor, S.A. de C.V. (laboratorio certificado internacionalmente).

El diagnóstico de SMet por el criterio ATP-III 2001 se estableció por la presencia de 3 o más de los siguientes 5 factores: 1) Obesidad abdominal: ≥ 102 cm en hombres y ≥ 88 cm en mujeres. 2) Triglicéridos elevados: ≥ 150 mg/dL. 3) HDL bajo: < 40 mg/dL en hombres, < 50 mg/dL en mujeres. 4) Presión arterial (sistólica/diastólica) elevada: $\geq 130/85$ mmHg. 5) Glucosa en ayuno elevada: ≥ 110 mg/dL. El diagnóstico por ALAD 2010, incluyó los mismos puntos de corte, para triglicéridos elevados, HDL bajo, presión arterial (sistólica/diastólica) elevada y glucosa en ayuno elevada, excepto para la obesidad abdominal, cuyo punto de corte fue de ≥ 94 cm en hombres y ≥ 88 cm en mujeres.

Análisis estadísticos

Las variables cuantitativas se reportaron como medias y desviación estándar y las categóricas como porcentajes. Se utilizó la prueba de t para muestras independientes para evaluar diferencias entre grupo (hombres y mujeres) y prueba de chi cuadrada para conocer la diferencia entre proporciones de los componentes alterados del SMet. Para evaluar las diferencias entre los grupos entre concordantes (individuos diagnosticados con SMet por ATP-III 2001 y ALAD 2010) *vs.* discordantes (individuos diagnosticados con SMet, solo por uno de los dos criterios), se utilizó el análisis comparación de medias usando la prueba de t student para muestras independientes. Se evaluó la significancia estadística a un valor de $p \leq 0.05$, usando el paquete estadístico SPSS versión 21.0.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran las características antropométricas, físicas y bioquímicas de la población general estudiantil analizada por sexo. Los datos antropométricos mostraron lo siguiente; los hombres presentaron valores más altos en peso (71.0 ± 14.2 *vs.* 59.9 ± 11.8), talla (169.7 ± 6.3 *vs.* 157.5 ± 6.0), IMC (24.6 ± 4.4 *vs.* 24.1 ± 4.3), cintura (84.6 ± 11.7 *vs.* 80.7 ± 10.9), PAS (114.4 ± 11.9 *vs.* 104.9 ± 11.4) y PAD (76.8 ± 8.9 *vs.* 70.9 ± 8.9) ($p \leq 0.05$). Para los datos bioquímicos los valores mostraron lo siguiente; triglicéridos con valores más altos (126.7 ± 100.8 *vs.* 110.4 ± 52.8) y por último en el caso del colesterol y colesterol HDL mostraron valores más altos para las mujeres; (166.3 ± 32.2 *vs.* 167.2 ± 30.6) y (45.0 ± 9.0 *vs.* 49.3 ± 9.9), respectivamente.

Tabla 1. Características generales antropométricas, físicas y bioquímicas en los estudiantes universitarios divididos por sexo.

CARACTERÍSTICAS	TOTAL (n=5535) (Media ± DE)	HOMBRES (n=1760)	MUJERES (n=3775)
Edad (años)*	19.7 ± 3.4	20.0 ± 3.3	19.6 ± 3.5
Peso (Kg)*	63.4 ± 13.6	71.0 ± 14.2	59.9 ± 11.8
Talla (M)*	161.4 ± 8.4	169.7 ± 6.3	157.5 ± 6.0
IMC (Kg/m ²)*	24.2 ± 4.3	24.6 ± 4.4	24.1 ± 4.3
Cintura (cm)*	82.0 ± 11.3	84.6 ± 11.7	80.7 ± 10.9
PAS (mmHg)*	107.9 ± 12.3	114.4 ± 11.9	104.9 ± 11.4
PAD (mmHg)*	73 ± 9	76.8 ± 8.9	70.9 ± 8.9
Glucosa (mg/dL)*	89.5 ± 11.3	91.2 ± 12.8	88.7 ± 10.5
Triglicéridos (mg/dL)*	115.6 ± 72.0	126.7 ± 100.8	110.4 ± 52.8
Colesterol (mg/dL)	47.9 ± 9.8	166.3 ± 32.2	167.2 ± 30.6
Colesterol HDL (mg/dL)	166.9 ± 31.1	45.0 ± 9.0	49.3 ± 9.9

IMC. Índice de Masa Corporal. **PAS.** Presión Arterial Sistólica. **PAD.** Presión Arterial Diastólica. Comparación entre sexos por prueba de t para muestras independientes: *P≤0.05

Los resultados del estudio en la población total, mostraron una prevalencia del SMet por ATP-III 2001 del 6.0% y 8.8% por ALAD 2010. De acuerdo con los componentes del SMet, tomando en cuenta el criterio ATP-III 2001 para obesidad abdominal; los hombres presentaron una prevalencia menor que las mujeres (8.8% vs. 22.2%, p≤0.05) y para glucosa, de igual manera se encontró una menor prevalencia en hombres que en mujeres (2.0% vs. 0.9%, p≤0.05). Tomando en cuenta el criterio de ALAD 2010 para obesidad abdominal, la prevalencia fue

similar en hombres y mujeres (20.5% vs. 22.2%, p>0.05) y para glucosa en ayuno alterada se encontró una prevalencia mayor en hombres que en mujeres (13.6% vs. 9.8%, p≤0.05). En el resto de los componentes, triglicéridos elevados y presión arterial elevada, se encontraron diferencias significativas (p≤0.05), siendo mayor en los hombres; por el contrario, el colesterol HDL bajo resultó mayor en las mujeres que en los hombres (55.0% vs. 28.8%, p≤0.05) (Tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia de síndrome metabólico y sus componentes por sexo en la población de estudiantes universitarios

Variable		Total n=5545 (%)	Hombres n=1671 (%)	Mujeres n=3539 (%)	Valor P*
Smet	ATP	6.0	5.3	6.4	0.000
	ALAD	8.8	8.2	9.2	0.000
Obesidad Abdominal	ATP	17.9	8.8	22.2	0.000
	ALAD	21.6	20.5	22.2	0.152
Glucosa en ayuno alterada	ATP	1.3	2.0	0.9	0.001
	ALAD	9.8	13.6	9.8	0.000
Triglicéridos elevados		18.9	23.6	16.7	0.000
Colesterol HDL bajo		46.7	28.8	55.0	0.000
Presión arterial elevada		3.6	7.5	1.7	0.000

*Prueba de chi cuadrada para diferencia de proporciones entre hombres y mujeres.

En la tabla 3 se muestra un resultado del perfil metabólico estadísticamente similar entre los grupos concordantes vs. los discordantes en las características de edad (21.4 ± 6.0 vs. 20.9 ± 4.8), peso (83.3 ± 15.6 vs. 81.6 ± 14.5), talla (163.1 ± 8.9 vs.

163.9 ± 8.9), presión arterial diastólica (80.9 ± 10.3 vs. 79.3 ± 10.9), presión arterial sistólica (118.9 ± 13.4 vs. 117.4 ± 12.4), glucosa (98.5 ± 31.3 vs. 97.9 ± 9.2) y colesterol total (190.2 ± 36.4 vs. 188.4 ± 6.2). No así en las variables de índice de masa corporal (31.2 ± 4.2 vs. 30.3 ± 4.3, p<0.05), cintura (100.8 ± 10.8 vs. 98.3 ± 9.2, p<0.05) y colesterol HDL (39.1 ± 6.5 vs. 48.0 ± 8.2, p<0.05) donde se observa un perfil metabólico mayormente adverso entre los grupos concordantes vs. los discordantes.

Tabla 3. Perfil metabólico entre discordantes y concordantes (ATP-III 2001 vs. ALAD-2010)

Característica	Concordantes n=325	Discordantes n=175	Valor P
Edad (Años)	21.4 ± 6.0	20.9 ± 4.8	0.399
Peso (Kg)	83.3 ± 15.6	81.6 ± 14.5	0.216
Talla (M)	163.1 ± 8.9	163.9 ± 8.9	0.318
IMC (Kg/m ²)	31.2 ± 4.2	30.3 ± 4.3	0.021
Cintura (cm)	100.8 ± 10.8	98.3 ± 9.2	0.011
PAD (mmHg)	80.9 ± 10.3	79.3 ± 10.9	0.118
PAS (mmHg)	118.9 ± 13.4	117.4 ± 12.4	0.235
Glucosa (mg/dL)	98.5 ± 31.3	97.9 ± 9.2	0.819
C-HDL (mg/dL)	39.1 ± 6.5	48.0 ± 8.2	0.000
C-Total (mg/dL)	190.2 ± 36.4	188.4 ± 6.2	0.597

PAD Presión Arterial Diastólica. **PAS** Presión Arterial Sistólica. Valores presentados como (Media ± DE). Comparación entre grupos por prueba de t para muestras independientes.

En la figura 1 se puede observar que los hombres mostraron una prevalencia de SMet de 5.3% con el criterio ATP-III 2001 y 8.2%, usando el criterio de la ALAD 2010. Los resultados no son diferentes en el sexo femenino donde los valores coinciden en tres puntos porcentuales con una prevalencia del 6.4% con el criterio ATP-III 2001, mientras que para ALAD 2010 se obtuvo una prevalencia del 9.2%.

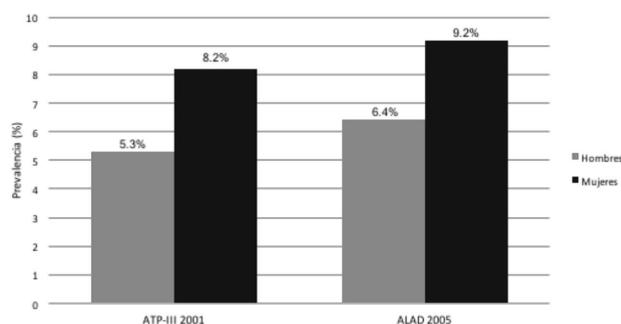


Figura 1. Prevalencia de SMet dividida por criterio diagnóstico y sexo.

DISCUSION

En su mayor parte, los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles están relacionados al comportamiento en el estilo de vida practicado en la niñez y adolescencia, lo que hace que estas conductas se acentúen en la edad adulta, pero cada vez en edad más temprana. La presencia de este continuo comportamiento en la población estudiantil implica un mayor crecimiento en el número de individuos poco saludables, favoreciendo así el desarrollo de sobrepeso y obesidad, factores ciertamente implicados en el riesgo de padecer SMet (Dragsbaek K *et al.*, 2016; Hua-Yin Li *et al.*, 2016).

En la muestra estudiada se encontró que de acuerdo con los datos antropométricos; peso, talla, cintura, PAS y PAD los hombres mostraron valores más altos; por el contrario, las mujeres presentaron valores superiores en los datos bioquímicos; triglicéridos, colesterol y colesterol HDL. Por otro lado, en relación a los componentes del SMet analizados, la prevalencia por criterio y sexo para la población se encontró lo siguiente; tomando en cuenta el criterio ATP-III 2001, los componentes obesidad abdominal y glucosa alterada los hombres mostraron un valor de (p<0.05) indicando así diferencias significativas. De manera similar, tomando en cuenta el criterio de ALAD

2010, solo para el caso de obesidad abdominal los hombres presentaron una prevalencia similar a la de las mujeres ($p > 0.05$). Para el resto de los componentes, triglicéridos elevados, HDL bajo y presión arterial elevada, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) siendo mayor en los hombres.

Otro hallazgo importante fue que entre el grupo de discordantes y concordantes (ATP-III 2001 *vs.* ALAD 2010) mostró un perfil metabólico similar en las características de edad, peso, talla, PAD, PAS, glucosa y colesterol total. Mientras que las variables IMC, cintura y colesterol HDL indican un perfil metabólico mayormente adverso entre las muestras concordantes *vs.* discordantes.

Finalmente, en el presente estudio se puede observar como resultado que la prevalencia de SMet basada en el uso de dos criterios, fue del 6.0% evaluada de acuerdo con el criterio ATP-III 2001 y del 8.8% por el criterio de ALAD 2010. Estos porcentajes se asemejan al estudio realizado en estudiantes ecuatorianos donde la prevalencia de SMet por IDF 2009 en estudiantes universitarios entre los 18-24 años es del 6.8%. En otros países como Chile y Argentina se encontró una prevalencia de 4.9% por ATP-III 2001 y 4.1% por IDF 2009, respectivamente, en poblaciones con características similares, lo que indica que las enfermedades metabólicas cada vez son mayores en países en vías de desarrollo (Ruano *et al.*, 2015, Nieto *et al.*, 2015, Martínez *et al.*, 2012).

El incremento paralelo de la frecuencia de la obesidad y del SMet es un fenómeno mundial y México no es la excepción (García-García *et al.*, 2008). De acuerdo con un análisis realizado en una submuestra de la ENSANUT 2006, realizado por Rojas-Martínez *et al.*, 2006, se encontró una prevalencia de SMet de 27.0% en mujeres y 18.4% en hombres usando los criterios de la IDF 2010. Asimismo, se encontró que la prevalencia de diabetes no diagnosticada e hipertensión era 5.2 y 14.3% en mujeres, respectivamente, y 8.0 y 21.0% en los hombres, respectivamente. En referencia a la prevalencia de obesidad abdominal en nuestro país, en los últimos 12 años se ha observado un incremento promedio anualizado de 1.3%, siendo este mayor en el periodo 2000-2006 (2.1%) que en el periodo 2006-2012 (0.3%) (Barquera *et al.*, 2013).

En México, en la población adulta (20-69 años) hay más de 17 millones de hipertensos, más de 14 millones de dislipidémicos, más de 6 millones de

diabéticos, más de 35 millones de adultos con sobrepeso u obesidad y más de 15 millones con grados variables de tabaquismo (Olaiz-Fernández *et al.*, 2011). En América Latina 75% de la mortalidad total en adultos se debe a enfermedades crónicas (Lopez *et al.*, 2006). Nuestra pirámide poblacional muestra que la mayoría de los adultos (75%) tiene menos de 55 años edad y aunque la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular es mayor después de los 40 años, en datos absolutos, los millones de portadores de estos factores de riesgo corresponden a la población económicamente activa (Velázquez *et al.*, 2003).

Al analizar la prevalencia de SMet dividida por sexo, en nuestro estudio los hombres expresaron porcentajes menores que en las mujeres en ambos criterios, siendo estos de un 5.3% para el criterio ATP-III 2001 y con un 8.2% para ALAD 2010. Por el contrario, para el caso de las mujeres se observó una prevalencia mayor para los dos criterios, un 6.4% y 9.2%, respectivamente. Con estos hallazgos se puede deducir que el sexo femenino se encuentra más alterado en los componentes que diagnostican un estado prepatológico de enfermedades crónico degenerativas.

Otro estudio similar realizado en las áreas rural y urbana de la provincia de Segovia por medio de los mismos criterios de definición SMet (ATP-III 2001), indicó una prevalencia global del SMet ajustada por edad y sexo del 17% (un 15.7% en varones y un 18.1% en mujeres) y no se observaron diferencias entre las poblaciones de las áreas rural y urbana. La combinación de componentes del SMet más frecuente, tanto en varones como en mujeres, fue la obesidad abdominal, glucosa alterada en ayunas y presión arterial elevada. La prevalencia de SMet se asoció a la edad y a la obesidad en un modelo de regresión logístico multivariado (Martínez *et al.*, 2005). En Perú se ha reportado una prevalencia de 16.8% en la población adulta a nivel nacional y alrededor de 20 a 22% en la costa de ese país, incluyendo Lima, datos consignados según el criterio del ATP-III 2005. Otros datos de este país presentaron una prevalencia de SMet en mayores de 20 años de 25.8%, en ambos estudios la población femenina es la que presentó mayor prevalencia de SMet (Lizarzaburu R., 2013).

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad diagnóstica del SMet de acuerdo con los últimos criterios diagnósticos, que han sido propuestos por (ATP-III 2001 y ALAD 2010). Así como

caracterizar en hombres y mujeres el riesgo en los componentes antropométricos y bioquímicos individuales del SMet de acuerdo con estos dos criterios. Se han hecho varios intentos para unificar los distintos criterios de SMet, sin embargo, en la actualidad no se ha logrado un criterio estándar que pudiera aplicarse universalmente para el diagnóstico. La existencia de varios criterios de diagnóstico hace que las prevalencias de este síndrome en una misma población y entre poblaciones difieran sustancialmente dependiendo del criterio utilizado y de las mismas características de la población estudiada, lo que dificulta la interpretación epidemiológica de los resultados.

Por lo anterior, se considera recomendable continuar realizando este tipo de estudios que permitan conocer e identificar poblaciones en riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles para diagnosticar y tratar de manera adecuada a los pacientes con SMet. De igual forma, es importante proponer medidas preventivas, no farmacológicas, para revertir el SMet en la población universitaria, como el desarrollo de cápsulas informativas que ayuden a generar conciencia del autocuidado y brindar herramientas, así como elaborar actividades y campañas de enseñanza dirigidas a estudiantes con factores de riesgo para reforzar la importancia del control del SMet y minimizar el problema e impacto en el gasto de salud pública que se vive en muchos países desarrollados, pero principalmente en vías de desarrollo.

CONCLUSIÓN

La prevalencia de SMet fue del 6.0% evaluada por el criterio ATP-III 2001 y del 8.8% por el criterio de ALAD 2010. De acuerdo con la prevalencia dividida por sexo; los hombres con SMet mostraron una prevalencia del 5.3% con el criterio ATP-III 2001, mientras que de acuerdo con el criterio ALAD 2010 se obtuvo un 8.2%. Los resultados no son diferentes en las mujeres donde los valores coinciden en tres puntos porcentuales con una prevalencia del 6.4% con el criterio ATP-III 2001, mientras que para ALAD 2010 se obtuvo una prevalencia del 9.2%. La presencia de factores de riesgo en población estudiantil aumenta el número de individuos poco saludables, favoreciendo el desarrollo de obesidad y HDL bajo, factores implicados en el riesgo de padecer SMet.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los sujetos del estudio y el apoyo al Grupo PROA Diagnóstico Médico, S.A. Este estudio fue financiado por DGAPA-PAPIIT-IN223113, UNAM y FESI-DIP-PAPCA-2014-53, UNAM y es parte del Convenio de colaboración UACJ/AG/CV-22/2015 y Reg. No. UNAM: 41079-789-7-IV-15.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberti K., Eckel R., Grundy S., Zimmet P., Cleeman J., Donato K. (2009). *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention*. National Heart, Lung, and Blood Institute. American Heart Association. World Heart Federation. International Atherosclerosis Society and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16):1640-5.
- Barquera S., Campos-Nonato I, Hernández-Barra L., Pedroza-Tobías A., Rivera-Dommarco JA. (2013). Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud pública de México*, 55 (supl 2):S151-S160.
- Dragsbaek K, Neergaard J.S., Laursen J.M., Hansen H.B., Christiansen C., Beck-Nielsen H., et al. (2016). Metabolic syndrome and subsequent risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in elderly women: Challenging the current definition. *Medicine* 95(36):e4806.
- ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2012). Resultados nacionales. Primera Ed. Instituto Nacional de Salud Pública. Recuperado: 10 agosto de 2015. <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>.
- Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. (2001). Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program [NCEP] Expert panel on detection, evaluation and treatment of high cholesterol. *JAMA* 285:2486-2497.
- García-García, E., De la Llata-Romero, D., Kaufman-Horwitz, M., Tusié-Luna, M. T., Calzada-León, R., Vázquez-Velázquez, V., & Rosas-Peralta, M. (2008). La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública: Una reflexión. *Salud pública de México*, 50(6), 530-547.
- Gotthelf, S. J. (2013). Prevalencia de síndrome me-

- tabólico según definición de la International Diabetes Federation (IDF) en adolescentes escolarizados de la provincia de Salta, Argentina. *Rev Fed Arg Cardiol*; 42(2):119-26.
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., & Spertus, J. A. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*; 112(17): 2735-2752.
- Hua-Yin Li, Bang-Dang Chen, Yi-Tong Ma, Yi-Ning Yang, *et al.* (2016). Optimal cutoff of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio to detect cardiovascular risk factors among Han adults in Xinjiang. *Journal of Health, Population and Nutrition*; 35(1):1-9.
- Martínez, M. A., Leiva, A. M., Sotomayor, C., Victoriano, T., Von Chrismar, P., & Pineda, S. (2012). Factores de riesgo cardiovascular en estudiantes de la Universidad Austral de Chile. *Revista médica de Chile*; 140(4): 426-435.
- Martínez Larrad María Teresa, Fernández Pérez, González Sánchez y cols. (2005) Prevalencia del síndrome metabólico (criterios del ATP-III). Estudio de base poblacional en áreas rural y urbana de la provincia de Segovia. *Med Clin Barc.*; 125(13):481-6.
- Nieto, C. I. R., Pérez, J. D. M., Freire, L. M., Morales, K. R. D. P., & Romero, C. V. E. (2015). Prevalencia de síndrome metabólico y factores de riesgo asociados en jóvenes universitarios ecuatorianos. *Nutrición Hospitalaria*; 31(n04):1574-1581.
- Lizarzaburu Robles J. C. (2013). Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *An Fac med.*; 74(4):315-20.
- Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T., & Murray, C. J. (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet*, 367(9524), 1747-1757.
- Olaiz-Fernández, G., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Rojas, R., Villalpando-Hernández, S., Hernández-Ávila, M., & Sepúlveda-Amor, J. (2011). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
- Ruano Nieto, César Ignacio, Melo Pérez, Jorge David., *et al.* (2015). Prevalencia de síndrome metabólico y factores de riesgo asociados en jóvenes universitarios ecuatorianos. *Nut Hosp*; 31 (4): 1574-1581.
- Reaven G., Abbasi F, McLaughlin T. (2004). Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Prog Horm Res.*;59:207-23.
- Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., & Jiménez-Corona, A. (2012). Optimal cutoff points for the detection of undiagnosed type 2 diabetes, hypertension and metabolic syndrome in Mexican adults. *Salud Pública de México* 54(1):13-19.
- Rosas Guzmán, J., González Chávez, A., Aschner, P., & Bastarrachea, R. (2010). Consenso latinoamericano de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD): Epidemiología, diagnóstico, control, prevención y tratamiento del síndrome metabólico en adultos. *Rev Asoc Latinoam Diab*, 18(1): 25-44.
- Velázquez O, Rosas M, Lara Ea, Pastelin HG, Sánchez CC, Grupo ENSA-2000, *et al.* (2003). Prevalencia en interrelación de las enfermedades crónicas no transmisibles y factores de riesgo cardiovascular en México. *Arch Cardiol Mex*, 73: 62-77.
- World Health Organization [WHO] Department of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva. (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complication. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.

Aspectos estructurales y mecanísticos de la enzima ureasa y sus proteínas accesorias

Luis Aguirre Reyes¹
Miguel Armando Ramos Soto¹
J. Aline Orozpe Olvera¹
Ernesto Lucero Orozco¹
Naun Lobo Galo¹
Luis Fernando Plenge Tellechea¹
Josá Valero Galván¹
Emilio Álvarez Parrilla¹
Alejandro Martínez Martínez¹
Ángel Gabriel Díaz Sánchez^{1*}

RESUMEN

Las infecciones secundarias derivadas de los procedimientos médicos son un problema central en el ámbito de la salud, con un gran impacto económico y social y constituye un reto de la comunidad científica y del personal médico. El índice de mortalidad por estas infecciones, llamadas infecciones nosocomiales, es alto. Actualmente es aceptado que los principales microorganismos responsables de estas infecciones son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans*, entre otros menos comunes. Adicionalmente al combate de estas infecciones se incluye el problema de la multirresistencia a antibióticos, que estas bacterias tienden a adquirir de forma horizontal con relativa facilidad. Las bacterias utilizan factores de virulencia que sirven para producir las condiciones preferentes para el establecimiento y colonización de los tejidos de sus hospederos. Algunos de estos factores de virulencia incluyen a enzimas, cuya actividad catalítica les provee un ambiente idóneo para la infección. El desarrollo de fármacos que neutralicen e inactiven a los factores de virulencia constituye un punto potencial de control antimicrobiano. Otra estrategia que se ha empleado para el desarrollo de nuevos tratamientos para combatir infecciones, es el uso de inhibidores específicos contra enzimas, cuya actividad es fundamental para el crecimiento de las bacterias. La actividad de la ureasa es esencial para la sobrevivencia de bacterias patógenas en los distintos ambientes presentes en los diferentes tejidos de hospedadores. La ureasa es una metaloenzima que requiere dos modificaciones postraduccionales importantes, dependientes de la hidrólisis de GTP y consisten en una carbamoylación en un residuo de lisina y la inserción de dos iones de níquel en el sitio activo. Esta maduración es dirigida por la GTPasa UreG y otras proteínas accesorias. La importancia de estas proteínas accesorias se ha descrito previamente en *K. aerogenes* y en *Helicobacter pylori*. Las infecciones producidas por cepas patógenas de *E. coli* han mostrado no solo un incremento, sino una re-

¹ Laboratorio de Bioquímica y Neuroquímica, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua., CP 03290, México.

* Autor de correspondencia: Laboratorio de Bioquímica y Neuroquímica, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua., CP 03290, México.e-mail: angel.diaz@uacj.mx)

currencia en pacientes con infecciones urogénicas y gastrointestinales. La ureasa y sus proteínas accesorias, como UreG son un blanco potencial para su control antimicrobiano. Sin embargo, el desarrollo de antibióticos requiere primero un entendimiento de su funcionamiento a detalles moleculares. En este trabajo de investigación mostramos algunos detalles del funcionamiento y de la estructura de la ureasa y sus proteínas accesorias derivados de estudios estructurales combinados con experimentos de cinética enzimática.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que aumentan la velocidad de las reacciones metabólicas a tasas sorprendentemente altas, en comparación con las mismas reacciones llevadas a cabo en ausencia de una enzima específica. Algunas de las enzimas de origen proteico tienen funciones no enzimáticas igualmente importantes que sus propiedades catalíticas desde el punto de vista biológico.

Por ejemplo, algunos receptores celulares con dominios de tirosina cinasas; o la acetilcolinesterasa, que aparte de modular las señales sinápticas, funciona como molécula de anclaje extracelular y como marcador inmunológico; y proteínas reguladoras de señalización, como algunas aldolasas. Hoy se sabe que algunas enfermedades están relacionadas con los cambios en la actividad biológica o en los niveles de expresión de una o varias enzimas, por ejemplo, en muchas enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo I, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico. Los microorganismos patógenos usan algunas de sus enzimas como factores de virulencia, con la finalidad de establecer y mantener una infección de forma eficiente.

Otros organismos secretan inhibidores específicos contra algún tipo de enzima; así estos obtienen una ventaja sobre otros en la competencia por los nutrientes o en la contención de agresiones químicas por parte de otros organismos. El entendimiento del funcionamiento de las enzimas es un problema central y complejo de las ciencias químicas y biológicas. El campo de la enzimología se ha expandido rápidamente durante los últimos años, de un enfoque inicial en el estudio de aspectos de los mecanismos químico y catalítico de enzimas individuales a esfuerzos recientes en entender la acción enzimática en el contexto de la dinámica molecular, y estudios de biología funcional. Algunos estudios enzimológicos han contribuido en enten-

der la relación entre las estructuras moleculares de las enzimas y su función y han resultado en una mejor comprensión de su evolución y comportamiento en el contexto de la complejidad de los sistemas biológicos [1].

De los esfuerzos derivados de la comprensión de la acción enzimática surgen aplicaciones biotecnológicas y médicas importantes cuando se logra conocer un panorama extenso acerca de los aspectos estructurales y mecanísticos del funcionamiento de estas macromoléculas. Por ejemplo, en el caso de que se estudie una enzima que es un factor de virulencia de un microorganismo patógeno, el desarrollo de un inhibidor específico es crítico para su control antimicrobiano cuando los antibióticos existentes han fracasado o atacan una variedad de blancos incluidas a algunas enzimas del hospedero, haciendo complicado su tratamiento. El éxito de esto requiere de un conocimiento extenso de las propiedades bioquímicas y estructurales de la enzima. La ureasa (EC 3.5.1.5) es una enzima que cataliza la hidrólisis de urea a amonio y carbamato, este último se hidroliza espontáneamente y genera bicarbonato y un segundo ion amonio.

Esta actividad se ha involucrado con el establecimiento de infecciones graves en humanos producidas por *Helicobacter pylori* en el tracto gástrico [2] y de especies de *Proteus* en el tracto urinario [3]. La actividad de la ureasa permite que las bacterias sobrevivan a ambientes ácidos, condición que impera en los tejidos preferentemente colonizados por estas bacterias, de allí que la ureasa juega un papel importante en la patogénesis de estas bacterias [4,5].

Durante la colonización del tracto urinario, el amonio producido por la actividad ureasa causa daño celular e inflamación, condición que favorece el establecimiento de la infección [6]. En el caso de especies de *Proteus* (*Proteus mirabilis*), se llega incluso a formar cristales o cálculos, debido a la presencia de amonio y bicarbonato producidos por la acción de la ureasa, por otro lado, el amonio liberado puede dañar la capa de glicosaminoglicano, la cual protege la superficie del tracto urinario de infecciones bacterianas [7]. La enzima de *Yersina enterocolitica* ha sido implicada como un factor artrogénico en el desarrollo de artritis reactiva, inducida por patógenos [4]. La actividad de la ureasa se encuentra ampliamente distribuida en gran parte del dominio bacteria, y los genes que de esta enzima y los que son requeridos para su

maduración se pueden transferir horizontalmente con relativa facilidad. Estos genes se han clonado y caracterizado y los mecanismos genéticos a partir de numerosas especies bacterianas se han propuesto. En especial se han estudiado los genes de cinco especies: *Bacillus sp* (TB-90), *Klebsiella aerogenes*, *P. mirabilis*, *H. pylori* y *Y. enterocolitica* [8]. La expresión de la ureasa puede ser regulada por el nitrógeno, se induce por la presencia de urea, o bien puede ser constitutivamente expresada [8]. Aunque se conocen detalles bioquímicos y clínicos de estas enzimas aún falta información para lograr entender el funcionamiento detallado de estas enzimas.

El incremento en la prevalencia de cepas de *Escherichia coli* uro-patogénicas (UPEC) resistentes a múltiples antibióticos ha complicado el tratamiento de infecciones urinarias [9,10]. Las cepas UPEC son responsables de la mayoría de las infecciones tracto urinarias [10–13] se han encontrado en un 70 a 90% de un total de siete millones de casos a cistitis aguda y en 250 000 casos de polineuritis, según reportes anuales en los Estados Unidos de América [11]. La incidencia es mayor en las mujeres, en donde en un 50% de mujeres de 20 años de edad han presentado una infección tractourinaria [11]. Las UPEC son un problema de salud y son responsables de gastos de fondos públicos y sociales [14][15].

Mediante un análisis de aislados de infecciones tractourinarias se han logrado establecer patotipos de *E. coli* [10], aunque en estos casos la información de la participación de la ureasa en la infección y de estudios bioquímicos es escasa. En México recientemente se realizó un estudio de la prevalencia de cepas de UPEC, de aislados clínicos de pacientes diagnosticados con infecciones del tracto urinario, se estudió la resistencia a diferentes antibióticos, los distintos serotipos, y los grupos filogenéticos [16]. El serotipo predominante es la cepa denominada O25:ST131, la cual presenta resistencia a ampicilina, piperacilina, a fluoroquinolonas y a trimetoprima/sulfametazol (TMP/SMX). Esta cepa no solo se ha aislado en México, sino que se ha encontrado diseminada a nivel mundial [17]. La cepa O25:ST131 es ureasa positiva y hasta la fecha no se ha descrito de forma clara el papel de su ureasa en la virulencia y tampoco se conocen detalles de sus parámetros cinéticos, ni de la estabilidad estructural, ni de su mecanismo catalítico, y mucho menos si es blanco de algún antibiótico actualmente conocido. El conocimiento de estos detalles es importante, ya que el

entendimiento de las correlaciones entre la estructura y la función de esta proteína permitirá desarrollar inhibidores específicos que puedan ser usados para el tratamiento de la infección producida por las cepas UPEC.

En la literatura se ha reportado el uso de algunos inhibidores con posibles aplicaciones en medicina. Estos incluyen a diferentes compuestos como fosforoamidatos, derivados de la urea, quinonas, hidroxilamatos y algunos heterociclos, principalmente en base a nitrocompuestos. El ácido acetohidroximico ha sido el compuesto más utilizado en terapias clínicas, a pesar de sus indeseables efectos secundarios, junto con algunas alternativas en base de extractos herbales. A pesar de que la ureasa es una enzima ampliamente estudiada, por ejemplo, fue la primera enzima en cristalizarse, aun no se entiende completamente su mecanismo de acción catalítica, ni se conocen detalles de las relaciones entre sus propiedades catalíticas y su estructura.

Para extender el conocimiento del funcionamiento de las ureasas y poder tener pistas de su papel en la colonización y establecimiento bacteriano durante infecciones, son necesarios estudios estructurales combinados con experimentos de modificación química, análisis biofísicos y estructurales y mutagénesis sitio-dirigida. En nuestras investigaciones estamos estudiando las ureasas de algunas bacterias patógenas y de algunas de plantas. La estrategia que seguimos es realizar una caracterización funcional y estructural, también estamos identificando nuevos inhibidores de la enzima con el fin de utilizarlos en la eliminación de infecciones nosocomiales; dichos inhibidores los buscamos a partir de dos fuentes: en la base de datos Zinc (más de 600,000 farmacos) y partir de extractos vegetales. Hemos logrado identificar siete compuestos con potencial aplicación médica (resultados no mostrados). La máxima actividad ureolítica de ureasa se alcanza en presencia de bicarbonato y las proteínas accesorias (UreD-UreE-UreF/H-UreG), de las que destaca UreG quien transfiere ion níquel y facilita la incorporación de bicarbonato a las cavidades catalíticas de ureasa.

LA UREASA

Es una enzima que ha despertado el interés en el campo de la biotecnología y en el campo de la medicina. En ambos casos el objetivo es lograr su inhibición [5,18–23]. Con el fin de encontrar inhibidores potentes, el conocimiento de detalles atómicos de

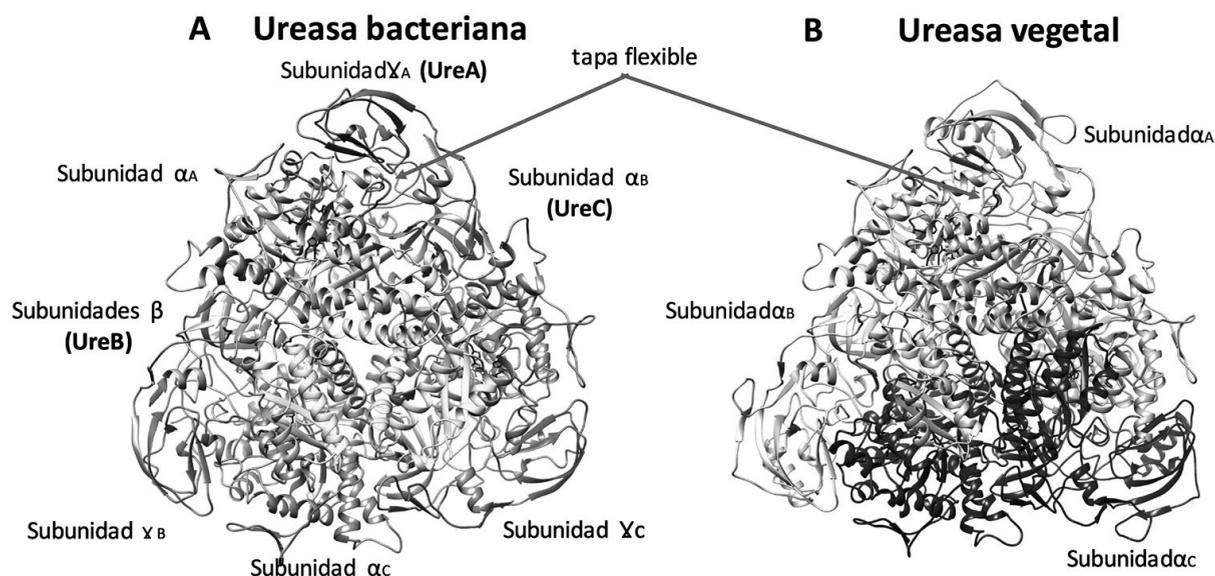


Figura 1. Estructura de la ureasa. (A) Ureasas bacterianas con tres subunidades. (B) Ureasa de plantas y hongos con una sola subunidad. La figura se obtuvo usando las coordenadas cristalograficas de la estructura de *K. aerogenes* (código PDB:2KAU) y de *Jack bean* (código PDB:3LA4). Imágenes generadas con USCF-Chimera.

su estructura tridimensional, así como de su mecanismo catalítico son indispensables. Desde el punto de vista enzimológico, también es interesante estudiarla, ya que la ureasa aumenta la velocidad de hidrólisis de la urea 1015-veces comparada con su hidrólisis espontánea [24], uno de los aumentos en la velocidad de reacción más altos que puede producir una enzima hasta ahora descritos, y porque su sitio activo requiere de iones de níquel, una característica única entre las hidrolasas; además de que su completa maduración —unión de metales y carbamoilación— requiere la participación de proteínas accesorias [4,24,25].

La actividad de la ureasa se encuentra ampliamente distribuida en todo el dominio bacteria, y los genes de esta enzima se han clonado y caracterizado a partir de numerosas especies bacterianas. En especial se han estudiado los genes de cinco especies: *Bacillus sp* (TB-90), *Klebsiella aerogenes*, *P. mirabilis*, *Y. enterocolitica* y *H. pylori*. A pesar de que la ureasa fue la primer enzima que se logró cristalizar en 1926 [26], no se conoció su estructura tridimensional, sino hasta 60 años después [27]. Actualmente se cuenta con la estructura tridimensional de la enzima de *K. aerogenes* [28] y de otras especies: la de *H. pylori* [29], *Sporosarcina pasteurii* [19], *Canaivalia ensiformis* [27], *H. mustelae* [30], *Brucella melitensis* (PDB: 4FUR) y *Cajanus cajan* [31]. En cuanto a su arquitectura las enzimas bacterianas ge-

neralmente están formadas por tres distintas subunidades, dos de aproximadamente 11 y otra de 60.3 kDa [29]. La enzima funcional consta de tres copias de cada subunidad ($\alpha\beta\gamma$)₃, ensambladas en un trímero de trímeros (Figura 1), haciendo un total de tres sitios activos por molécula, en donde cada sitio activo presenta dos iones de Ni⁺² [24] en complejo con un residuo de Lys carbamoilado.

En la ureasa de *Bacillus pasteurii* se observa un asa flexible tapando la entrada del canal del sitio activo [25]. Con base en las estructuras de la ureasa, se han propuesto dos mecanismos catalíticos detallados para la enzima de *K. aerogenes* y para la de *B. pasteurii*, con diferencias menores ambos consisten en lo siguiente: (1) el oxígeno carbonílico de la urea desplaza a una molécula de agua que se encuentra coordinada con el Ni-1, y este es polarizado por una His; (2) una molécula de agua se coordina con el Ni-2 y tras ser activada ataca a la urea para formar un intermediario tetraédrico; (3) una histidina localizada en la tapa le cede un protón al grupo amido del intermediario y (4) finalmente el intermediario protonado se descompone a carbamato y amonio. El modelo involucra un mecanismo de protonación inverso en el cual el ácido tiene un pKa menor que el nucleófilo, dando como resultado a una fracción de la enzima inactiva a su pH óptimo. Aunque existen evidencias experimentales que apoyan este mecanismo [20, 24, 32, 33] actualmente no se ha logra-

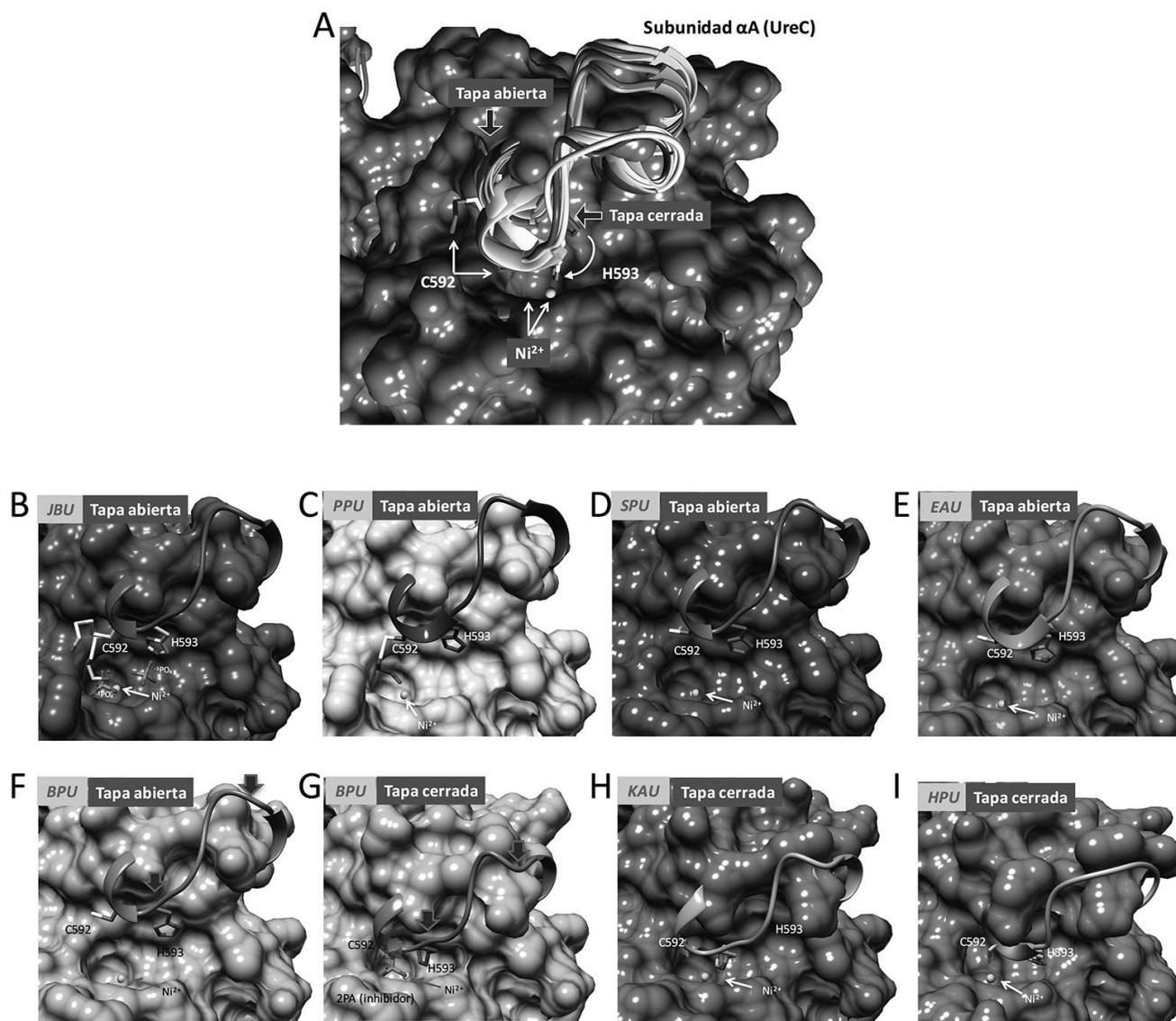


Figura 2. Conformaciones del asa flexible en la ureasa. (A) alineamiento estructural de las ureasas observadas en B a I. (B) ureasa de Jack bean, JBU (código PDB:3LA4), (C) ureasa de pigeon pea, PPU (código PDB:4G7E), (D) ureasa de *Sporosarcina pasteurii*, SPU (código PDB:4CEU), (E) ureasa de *Enterobacter aerogenes*, EAU (código PDB:4EP8), (F) ureasa de *Bacillus pasteurii*, BPU (código PDB:2UBP), (G) ureasa de *Bacillus pasteurii*, BPU (código PDB:3UBP), (H) ureasa de *Klebsiella aerogenes*, KAU (código PDB:2KAU) e (I) ureasa de *Helicobacter Pylori*, HPU (código PDB:1E9Z). Imágenes generadas con USCF-Chimera.

do generalizar y tampoco es clara la identidad del nucleófilo, es decir, si el Ni-2 se encuentra unido, o si coordina a un ion hidróxido; ni la identidad, ni el estado de protonación inicial del ácido general y otros aspectos que relacionan la estructura con la función de las ureasas.

La aclaración y un conocimiento más general del mecanismo catalítico de la ureasa requieren de datos bioquímicos y estructurales de más homólogos. La catálisis de la reacción facilitada por las enzimas ureasas es en parte favorecida por la flexi-

bilidad conformacional que presenta un asa localizada en la entrada del sitio activo (Figura 2). Se ha encontrado que la interacción de compuestos químicos con esta asa produce una inhibición [34–36]. Uno de los fármacos que identificamos en nuestros estudios, potencialmente interacciona con este asa y actualmente estamos investigando su mecanismo de inhibición desde el punto de vista cinético y estructural.

El uso de este compuesto y otros compuestos que interaccionan con esta asa proporcionan una

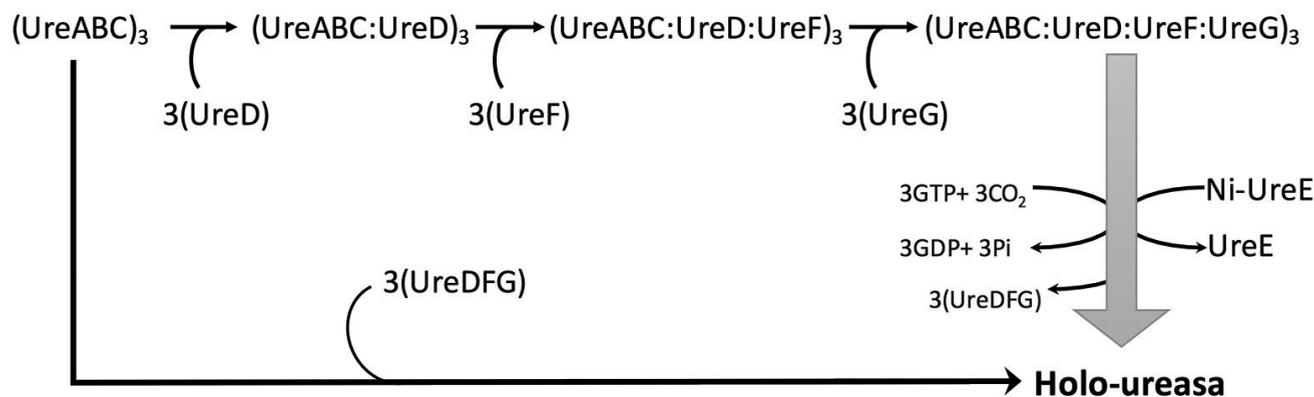
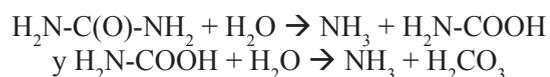


Figura 3. Modelo de unión de las proteínas accesorias UreD, UreF, UreG a la estructura de UreABC, mostrando actividad metalochaperona de UreE [43].

excelente oportunidad para inhibir esta importante enzima usada para el establecimiento, mantenimiento y recurrencia de infecciones.

La ureasa (EC 3.5.1.5) es una metaloenzima dependiente de níquel citoplasmática [4] que hidroliza urea formando amoníaco y ácido carbámico [26]. El ácido carbámico en una reacción espontánea posteriormente es convertido en amoníaco y bicarbonato, como se muestra en la siguiente ecuación:



La alta eficiencia de la catálisis enzimática es debido a la presencia de dos iones níquel en el sitio activo [24,37]. La hidrólisis de urea trae consigo un incremento del pH y permite tener una fuente de nitrógeno fácilmente asimilable [38]. Esta actividad ureolítica se ha involucrado con el establecimiento de infecciones graves en humanos producidas por bacterias como *Helicobacter pylori* en el tracto gástrico [39] y de *Proteus mirabilis* en el tracto urinario [40] por mencionar algunas, de allí que la ureasa juega un papel importante en la patogénesis de estas bacterias. Estudios recientes demuestran que la ureasa además de su actividad ureolítica puede inducir la agregación plaquetaria y la activación de lipooxigenasa [41], lo cual indica al menos dos dominios funcionales distintos presentes en la enzima.

La ureasa madura difiere en el número de subunidades entre especies, sin embargo presentan un 60% de similitud en la secuencia, siendo reflejado en su estructura terciaria [42]. En plantas y hongos la ureasa presenta un solo tipo de subunidad de 849 residuos de aminoácidos polipeptídicos forman-

do dímeros $[(\alpha_3)]_2$ [42][43], en *Helicobacter pylori* está compuesta de una subunidad gamma (UreA) de 238 residuos y una subunidad betha (UreB) de 569 residuos, organizados en un complejo $[(\gamma\beta)_3]$ [4], mientras que en especies de *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y ciertas cepas de *Escherichia coli* posee tres subunidades (UreA, UreB y UreC) organizados en un complejo $(\gamma\beta\alpha)_3$, de las cuales el peso molecular calculado es para UreA (11.1 kDa), UreB (11.7 kDa) y UreC (60.3 kDa) [44]. La maduración postraduccional de la ureasa en todas las especies estudiadas hasta la fecha requiere: (1) De residuo de lisina carbamylado por dióxido de carbono y (2) de la inserción de dos iones Ni^{2+} en cada uno de los sitios activos de la subunidad α , siendo el proceso dependiente de GTP [45].

Los iones de Ni en el sitio activo forman un complejo con el grupo carbamylado de la lisina. El Ni-1 presenta enlaces de coordinación con dos residuos de histidina y una molécula de agua mientras que Ni-2 con dos residuos de histidina, un ácido aspártico y una molécula de agua [43,46].

Estudios *in vitro* en *K. aerogenes* demostraron que incubando apoproteína ureasa con NiCl_2 100 μM y bicarbonato 100 mM, confiere el 15% de funcionalidad, al carbamilar residuos de Lys [43]. Sin embargo, la actividad máxima ureolítica se alcanza con la participación de cuatro proteínas accesorias (homólogos UreD/H, UreF, UreG y UreE) codificadas por cuatro genes que están presentes en el operón junto con ureasa (ureA, ureB y ureC) [4]. Siendo las proteínas UreD y UreF insolubles, mientras que UreG es soluble. Por tal motivo, esta última se ha podido caracterizar a partir de varias especies [43]. Debido a la insolubilidad de UreD al sobre-

expresarla, no se ha podido cristalizar, por lo que investigadores emplean la expresión de fusión de ureD con la unión a maltosa para hacerla soluble [47].

PROTEÍNAS ACCESORIAS INVOLUCRADAS EN MADURACIÓN DE LA UREASA

La maduración de la ureasa en *H. pylori* requiere de las proteínas accesorias: UreH, UreF, UreG las cuales forman un dímero de heterotrímeros (UreG/UreF/UreH)₂ de peso molecular de 156.7±0.5 kDa [48] y de la proteína UreE que actúa como metalochaperona. La proteína UreH induce cambios conformacionales en UreF, produciendo cambios en asas flexibles de UreF [44,49], este complejo UreF/UreH formado tiene esencialmente la misma conformación antes y después de unirse a la proteína UreG, formando el complejo UreG/UreF/UreH [48]. Esta unión de proteína-proteína facilita la dimerización de UreG, pudiéndose formar un sitio de unión de Ni por intercambio de dominios de cadenas de Cys66-Pro67-His68, de los cuales Cys66 e His68 se proponen como ligandos de unión a iones níquel y zinc. Esta unión entre UreG al complejo UreF/UreH solo se da por medio de la interacción con la proteína UreF, siendo los residuos involucrados en la unión de la proteína UreG de *H. pylori* (Glu-62, Gly-64, Asp-74, Ser-76, Asn-109, Glu-111, Arg-130, Lys-131 y Arg-138), los cuales mantiene contacto con las regiones asa de la proteína UreF [48].

En *K. aerogenes* se ha observado que la proteína UreD se une tanto a UreB y UreC, confiriendo por sí sola a la apoproteína ureasa 30% de su funcionalidad [43,50] mientras que UreF solo se une a UreB ([47]). Debido a que el complejo UreDFG es una especie poco soluble, no se ha podido caracterizar completamente.

El modelo de unión de las proteínas accesorias a la estructura de UreABC mostrado en la Figura 3, propone dos rutas, ya sea que las proteínas UreD, UreF y UreG se unan secuencialmente o que se ligue el complejo UreDFG a los vértices de la UreABC [43]. Siendo necesario para activar la ureasa en especies formadoras de complejos (UreABC)₃ la adición de dos iones Ni⁺² a sus tres sitios activos de la enzima “por cada subunidad UreC” [47]. El proceso requiere de la hidrólisis de GTP, la incorporación de CO₂ para carbamilar residuo de Lys y de la metalochaperona UreE

para entregar níquel [44]. Sin embargo, a pesar de los estudios realizados a la fecha, también es desconocido cómo las proteínas accesorias son liberadas, si lo realizan como una unidad UreDFG o como proteínas individuales.

Proteína Accesorias UreF

El complejo (UreF/UreH)₂ de peso molecular de 123.10.9 kDa es necesario para dimerizar la proteína UreG, cumpliendo esta su función. Siendo comprobado por estudios de mutagénesis realizados por Fong en los residuos R179A y Y183D sobre la proteína UreF, causante de una homodimerización deficiente del complejo UreF/UreH. Esta deficiencia para reclutar UreG impidió tener actividad ureolítica por parte de la ureasa [48]. A la vez, se demostró que UreG tiende a disociarse del complejo UreF/UreH, en adición de GTP aumentando esta disociación en presencia de níquel.

Proteína Accesorias UreE

En cepas de *K. aerogenes* se ha observado que la actividad máxima catalítica de la ureasa se alcanza en presencia de UreE (17.6 kDa) [44], debido a su actividad como metalochaperona que transporta el ión metálico al complejo UreABCDFG [43]. Esta proteína presenta en *K. aerogenes* 10 residuos de Histidina en el C-terminal, siendo la proteína HypA un análogo de UreE [51].

En un estudio con cobre en UreE se asumió que residuos de His-110 e His-112 pueden actuar como depósitos de Ni para poder así facilitar el aporte de níquel a la ureasa [51]. Estudios estructurales y de mutagénesis indican que para unir el ión metálico se requiere de un dímero, en el cual un dominio de la intercara se encarga de unir el ión, mientras que el segundo dominio es probable que participe en el reconocimiento del complejo ureABCDFG ya que presenta una estructura semejante al dominio de la chaperona Hsp40 [49]

Proteína Accesorias UreD

El locus ure se puede encontrar en orden ureABCEFGD o ureDABCEFG. En cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) la secuencia de los genes es similar a la secuencia de especies como: *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* donde se agrupan en el orden ureDABCEFG, siendo el gen ureD el más variable [50]. La secuencia de los genes ure de *K. aerogenes* son los más similares a la secuencia de

EHEC, teniendo entre un 76–96% de similitudes con las siete proteínas ureasa. Esta proteína presenta un peso molecular de 29.8 kD_a.

Las cepas de EHEC son patógenos colonizadores del intestino grueso en humanos causantes de manifestaciones clínicas como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. En los Estados Unidos la cepa EHEC O157:H7 es responsable de la mayoría de los brotes, sin embargo en otros países predominan serogrupos O26, O111 y O145 [47].

La actividad de la ureasa como factor de virulencia se ha propuesto en especies como: *Proteus mirabilis*, *H. pylori* y *Yersenia enterocolitica* por mencionar algunas; sin embargo en cepas de EHEC su papel en la patogénesis no está definido. La falta de información sobre el papel de la ureasa en EHEC puede deberse a que muy pocas cepas de EHEC *in vitro* demuestran un fenotipo de ureasa positivo, siendo debido hasta la fecha por: (1) La sustitución del nucleótido C742T en la cadena C-terminal de ureD dando como resultado un cambio de glutamina en posición 248 por codón ámbar (UAG) de truncamiento prematuro y (2) la sustitución del nucleótido C113T cambiando leucina (L) por prolina (P) en posición 38. Encontrándose la sustitución C742T altamente conservada en cepas EHEC ureasa negativas [47].

Estudios a partir de polimorfismos de ureD en EHEC han identificado sustitución de prolina por leucina en posición 205 sin embargo, la P205L es menos conservada (solo 30% de las especies la presentan) y se ha determinado que la sustitución de leucina por prolina (L205P) no confiere un incremento de la actividad ureolítica, a diferencia de la posición 38, donde la sustitución por prolina (L38P) confiere un incremento de la actividad catalítica. Estos estudios indican que por tal motivo, *in vitro*, una ureasa negativa no son indicadores solo de una mutación ámbar en UreD [47].

UreG y la superfamilia GTPASAS

Las GTPasas son una superfamilia de proteínas presentes en procariotas como en eucariotas, capaces de unir e hidrolizar el GTP. Éstas desempeñan una gran variedad de funciones tales como: La proliferación celular, la transducción de señales y control del ciclo celular, la traducción y síntesis de proteínas, el transporte vesicular y la translocación de proteínas a través de la membrana por mencionar algunas. Las GTPasas se caracterizan principalmente por tener un dominio G con un plegamien-

to y una estructural muy similar. A este dominio conservado se le pueden adicionar otros dominios amino o carboxiterminales los cuales pueden tener funciones independientes o relacionadas con la actividad GTPasa. El dominio G de las GTPasas mantiene conservado cuatro secuencias (motivo G1, G2, G3 y G4) responsables de la interacción con el nucleótido y los efectores con excepción de algunas pocas GTPasas como la adenilsuccinato sintetasa. Además en ciertas GTPasas se presenta un motivo G5 conservado [52].

Los motivos G1, G3, G4 y G5 son los responsables del reconocimiento, unión e hidrólisis del GTP y de la interacción con el cofactor Mg²⁺. Mientras que el motivo G2 permite la interacción con el posible efector y con la correspondiente GAP (proteínas activadoras de GTPasas). Ésta superfamilia se clasifica en 20 familias y 57 subfamilias, incluyéndose algunas ATPasas, ya que presentan un motivo estructural P-loop (bucle de unión al fosfato) presente en el motivo G1. Algunas proteínas con actividad ATPasa mantienen esta característica a pesar de carecer de actividad GTPasa

Superfamilia Proteínas RAS (GTPASAS pequeñas)

De las familias de GTPasas eucarióticas destaca la superfamilia de proteínas tipo Ras [52], dividiéndose las GTPasas pequeñas de acuerdo con su función en al menos cinco familias principales: (1) Ras (Sarcoma de Ras) involucradas en la regulación de la expresión génica, apoptosis, proliferación, diferenciación y morfología celular; (2) Rho (Homólogos de Ras) participan en la reorganización de los filamentos de actina, regulación del ciclo celular y la expresión génica; (3) Rab (Ras igual a las proteínas en el cerebro) controlan el transporte vesicular y el tráfico de proteínas entre distintos orgánulos; (4) Arf (Factor de ADP-ribosilación) regulan tráfico vesicular y (5) Ran (Ras igual a nuclear) implicadas en el transporte núcleo-citoplasmático de RNA y proteínas. Esta superfamilia de GTPasas pequeñas, son las más estudiadas hasta la fecha, sirviendo como modelo para el estudio del resto de las GTPasas tanto en eucariotas como procariotas. El ciclo de las GTPasas clásicas (ejemplo: proteínas Ras), se encuentran en dos estados conformacionales: unido al GTP (estado activo) y unido al GDP (estado inactivo) [52]. Debido a su baja actividad GTPasa intrínseca, suele implicarse la unión del factor GAP para catalizar el paso de hidrólisis del fosfato gamma del

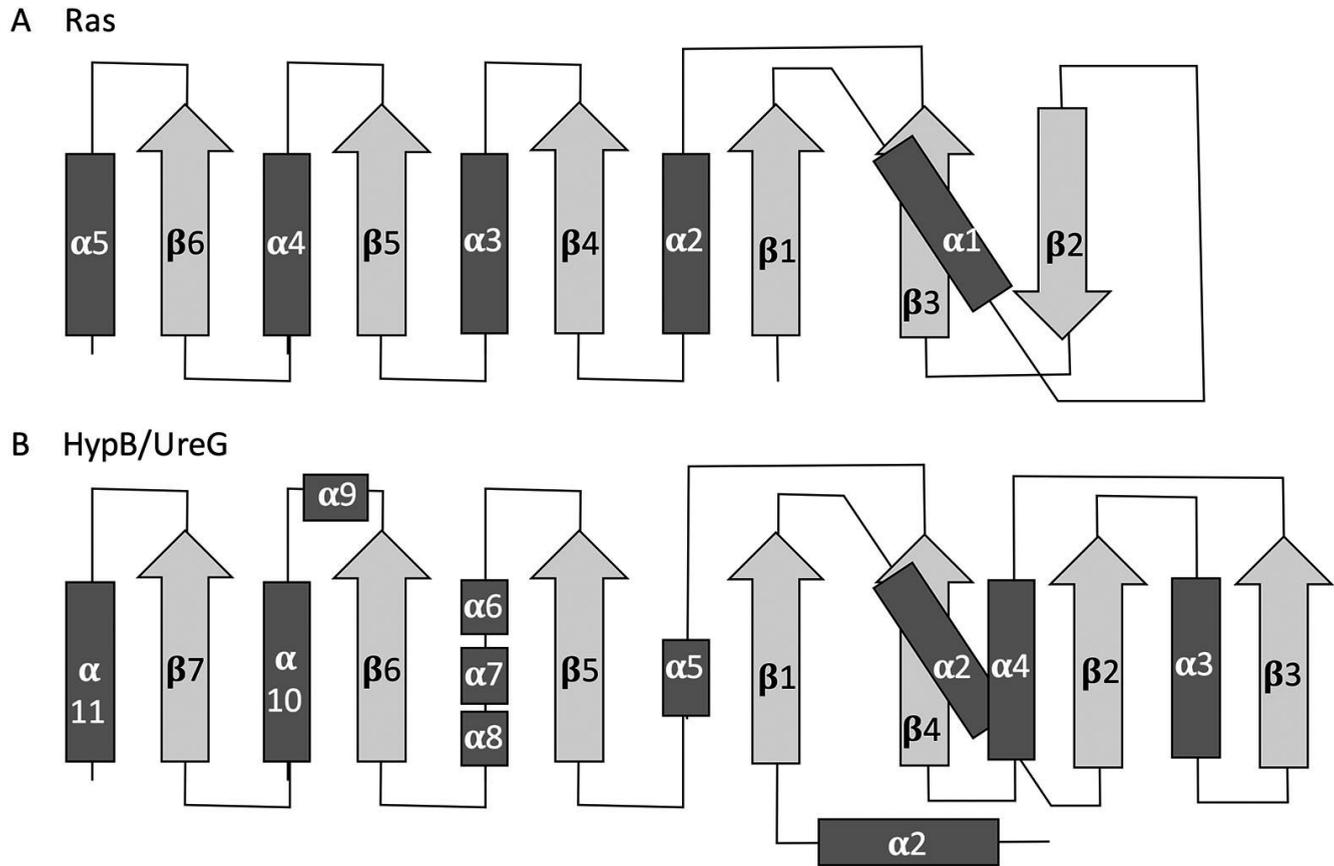


Figura 4. A) Topología de las proteínas Ras y B) Topología de la proteína HypB-UreG (Gasper et al., 2006)

nucleótido unido a la proteína GTPasa. Igualmente debido a la alta afinidad de las GTPasas por los nucleótidos de guanina se requiere de la proteína GEF (factor de intercambio de guanina), la cual permite que las GTPasas vuelvan a su estado libre y pueda la GTPasa reiniciar su nuevo ciclo. Tanto la proteína GAP y GEF son específicos para cada una de las GTPasas.

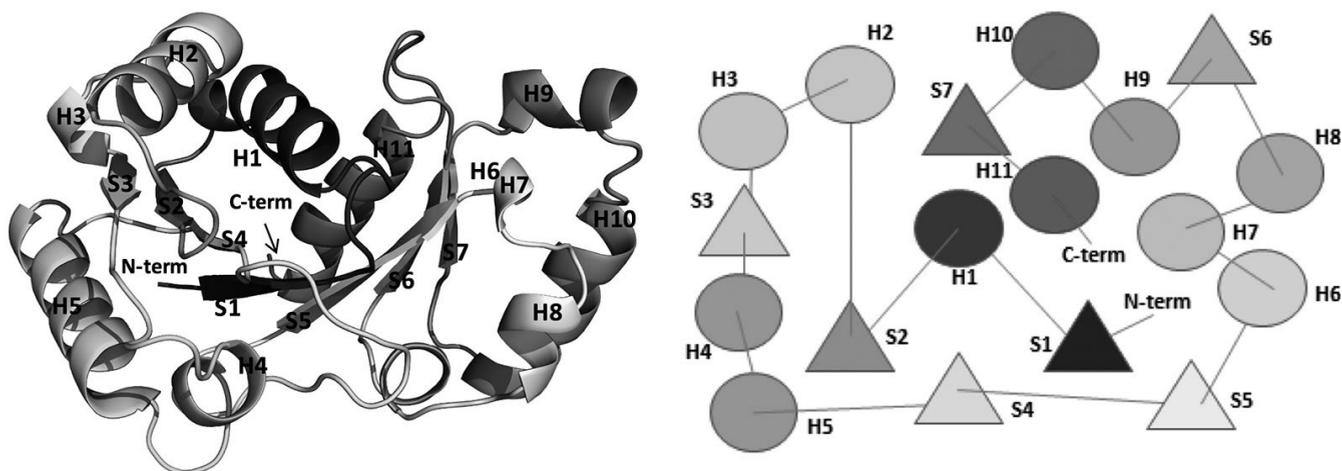
La topología de las proteínas tipo Ras mostrada en la Figura 4, consiste en seis láminas β siendo solo una antiparalela y cinco hélices α localizadas en los extremos de las hojas. La clasificación de proteínas con esta topología se conoce como de clase TRAFAC [53].

Proteína Accesoria UREG

La proteína UreG es miembro de la clase SIMIBI de GTPasa, las cuales frecuentemente requieren estar en su forma dimérica para llevar a cabo sus funciones [51], en *H. pylori* mediante difracción de rayos X se observó que la GTPasa presenta estructuralmente motivo G1, G2, G3, G4 y G5 [48]. Esta proteína

por medio de la hidrólisis de GTP transfiere el Ni^{2+} al sitio catalítico de la ureasa, siendo este paso crucial para la activación de la ureasa, ya que la sustitución de su sustrato por un análogo no hidrolizable ocasiona una ureasa inactiva [54].

La proteína UreG presenta un peso molecular de 24.4 kDa, mientras que su dímero en presencia de Ni y dos ligandos (GTP) tiene un peso molecular de 49.7. La dimerización de la proteína depende de la adición de níquel, GDP y GTP; presentando una tendencia a dimerizar UreG 40 μM en presencia de Ni^{2+} 0.5 mM con GDP 1mM y Ni con GTP 1mM, lo cual es demostrado con el peso molecular calculado por dispersión de luz estática, teniendo en presencia de Ni con GDP un peso molecular de 44.5 kDa, mientras que en presencia de Ni^{2+} con GTP de 46.8 kDa; conteniendo en ambos casos una estequiometría de 1.2 de níquel por dímero de UreG [48]. Sin embargo, la dimerización de UreG se ve estrechamente relacionada con la presencia de nucleótidos de guanina, sugiriendo que la dinámica molecular de UreG es regulada por la hidrólisis de GTP, ya que esta actividad



Residuos involucrados

- Hebras β \rightarrow 20.48% (residuos hidrofóbicos)
- Hélices α \rightarrow 42.92% (residuos anfipáticos)
- Giros β y asas \rightarrow 36.59%

Figura 5. Topología del modelo construido de UreG de *E. coli* O157:H7. Los triángulos representan hebras β , círculos representan hélices α y las líneas representan giros β y asas.

desfavorece la dimerización de la proteína liberando iones níquel en el proceso; siendo aumentada la actividad hidrolítica específicamente en presencia de bicarbonato, ya que se mantiene la actividad al añadir otra sal como: acetato, formato o sulfato.

De las cuatro proteínas accesorias de ureasa, la proteína UreG es la más conservada en las especies estudiadas hasta la fecha. Teniendo conservado el motivo de unión a metal Cys-Pro-His [55]. Este motivo es responsable de la unión de níquel como de la dimerización de UreG, siendo demostrado en UreG de *H. pylori* mediante mutagénesis de residuo C66A y H68A [48].

La proteína UreG en *K. aerogenes* es un monómero que puede unir níquel o zinc ($K_d \sim 5 \mu\text{M}$), en *H. pylori* UreG dimeriza uniendo ión zinc (K_d 0.33 μM) o se mantiene en forma monomérica uniendo dos iones níquel con menor afinidad (K_d 10 μM), mientras que en *Mycobacterium tuberculosis* y *Soporosarcina pasteurii* poseen proteína UreG dimerica que puede unir dos iones Zinc ($K_d \sim 40 \mu\text{M}$) y más débilmente níquel [43,44], teniendo para *M. tuberculosis* una k_{cat} de 0.01 min^{-1} [56] mientras que UreG de *S. pasteurii* tiene una k_{cat} de 0.04 min^{-1} [55], lo cual demuestra que por si solas mantienen una baja actividad GTPasa.

Hasta la fecha no se cuenta con una estructura de UreG libre, siendo el único modelo obtenido de ella el PDB 4HI0 donde se muestra en unión con otras proteínas accesorias. Sin embargo, esta proteína accesorias de la ureasa es la única en presentar homología de secuencia con otras proteínas. Tal es el caso que el gen *ureG* en *K. aerogenes* presenta 25% de similitud a la secuencia de *Escherichia coli* hypB, lo cual se ha aprovechado para crear modelos de UreG [55].

Estudios en *Helicobacter pylori* han demostrado que proteínas HypA y HypB son necesarias para activar tanto la hidrogenasa como para tener una completa actividad de ureasa, descartando la posibilidad de que la ureasa requiere de hidrogenasa para su activación [57]. Se ha podido cristalizar la proteína HypB, siendo resuelto por difracción de rayos X, observando que esta proteína es capaz de unir ión níquel. Mientras que HypA presenta la capacidad como dímero de unir dos iones Ni. En su estructura HypA contiene cinco residuos de histidina distribuidos dentro de la proteína (His2, His17, His24, His79 e His95) siendo el residuo de Histidina-2 esencial para la unión de níquel a la proteína [57].

Tanto la proteína UreG como HypB son GTPasas, las cuales presentan un dominio de unión a

nucleótidos conservados [GXXXXGK(S/T)] [53]. Sin embargo, a diferencia de la superfamilia de las proteínas Ras, la topología de HypB mostrada en la Figura 5, consiste en 7 láminas β paralelas y 11 hélices α , lo cual las clasifica como proteínas clase SIMIBI, que presentan topología distinta a TRAFAC [53].

La proteína HypB para llevar a cabo su función forma dímeros [53]. Estudios en esta proteína demuestran residuo Lys59 esencial para su actividad GTPasa [54], mientras que UreG en *H. pylori* modificación residuo Lys14 y en *K. aerogenes* expresada en *E. coli* modificación Lys20 y Thr21 por alanina en el motivo P-loop [52] provoca que carezca de actividad lítica la ureasa. Sugiriendo estos análisis la importancia de los residuos lisina y treonina, de unión a GTP motivo P-loop tanto para *K. aerogenes* como *H. pylori*, en la maduración de la ureasa [43]. Se ha observado que la carencia de actividad ureolítica a modificar en UreG residuo Lys14, es consistente aun al añadir níquel [54], mientras modificaciones en HypB residuo Lys59 restaura su actividad ureolítica al añadir níquel [57].

Estudios recientes indican que en ciertas especies, la activación de ureasa no requiere de la proteína UreG, ya que en *Helicobacter mustelae* un patógeno gástrico en hurones, presenta dos grupos de genes de ureasa: ureABIEFGH y ureA2B2. Tanto estudios en *H. mustelae* como en *E. coli* con expresión de genes ureA2B2 (UreA es 57% idéntica a UreA2 y UreB es 70% idéntica a UreB2 se observa actividad enzimática sin GTPasa [43]. Esta ureA2B2 es una enzima que contiene hierro lábil a oxígeno, lo cual puede indicar que las bacterias han evolucionado [43]. La habilidad de cepas de *E. coli* para formar ureasa de hierro activa utilizando solo ureA2B2 implica que no se requiere de las proteínas accesorias para carbamilar el residuo de Lys.

Sin embargo, en la gran mayoría de estudios sobre actividad ureolítica se ha observado un máximo de actividad en presencia de UreG. Esto convierte a UreG en un potencial blanco de control antimicrobiano, ya que interrumpiría la maduración postraducciona de la ureasa, afectando la colonización e invasión de tejidos, de especie con actividad ureolítica. Siendo objeto de estudio de

esta tesis el conocer y extender el conocimiento bioquímico y estructural de UreG bacteriana; el establecer relaciones entre la estructura tridimensional y el funcionamiento de UreG; lo que permitirá identificar residuos esenciales para su buen funcionamiento pudiendo así desarrollar o mejorar inhibidores dirigidos contra especies productoras de ureasa complejo (UreABC)₃ y posiblemente formadoras de otros complejos.

MODELO ESTRUCTURAL DE UREG DE *E. COLI*

La familia GTPasa-UreG generalmente presenta cinco hélices largas y siete hebras cortas, encontrándose en algunas secuencias dos hélices adicionales (H4 y H5) y una hebra (S4) [55]. Con base en el modelo construido del monómero de EcUreG O157:H7, mostrado en la Figura 5, se identifica la presencia de siete hebras β y once hélices α conectadas por medio de asas; estando involucrado el 20.48% de los residuos de la proteína en la formación de hebras β , mientras que 42.92% de los residuos forman hélices alfa, siendo el 36.59% restante comprendido por giros β y asas. La topología en el modelo de EcUreG muestra que la mayor cantidad de residuos hidrofóbicos están presentes en las hebras β , constituyendo el núcleo hidrofóbico de la proteína, mientras que en las hélices α se encuentra gran cantidad de residuos anfipáticos, lo cual concuerda con los resultados reportados previamente respecto a la proteína UreG de *Bacillus pasteurii* [55].

La topología de esta proteína muestra la presencia de dos hojas β , como se aprecia en la Figura 6, siendo una formada por las hebras S1, S2, S3 y S4 mostrada de color azul y la otra por S5, S6 y S7 mostrada en color amarillo. Las hebras se pliegan en medio barril, teniendo topología tipo Rossmann que hasta la fecha no ha sido descrito en UreG. Esta proteína presenta en su estructura dos Cisteínas (Cys28 y Cys72) apreciándose en el modelado que únicamente Cys72 está disponible, la cual está involucrada en la unión al ion metálico. A la vez, presenta en su secuencia primaria dos Triptófanos (Trp35 y Trp179) estando ambos disponibles, lo cual permite calcular la unión de sustratos e inhibidores mediante estudios de fluorescencia intrínseca de la proteína.

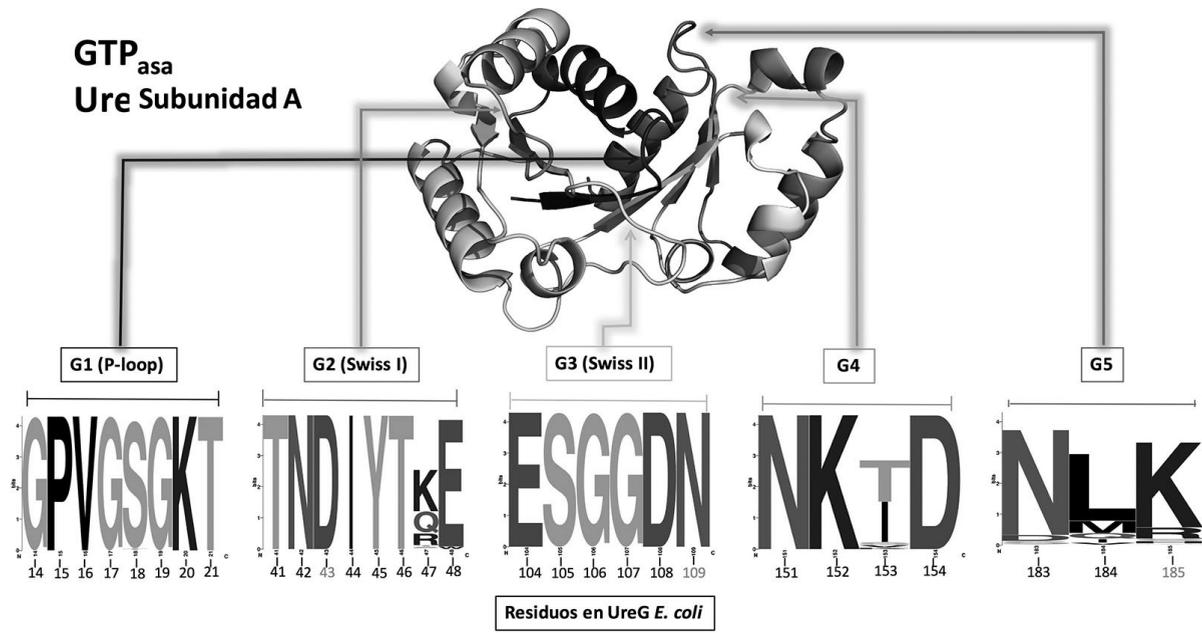
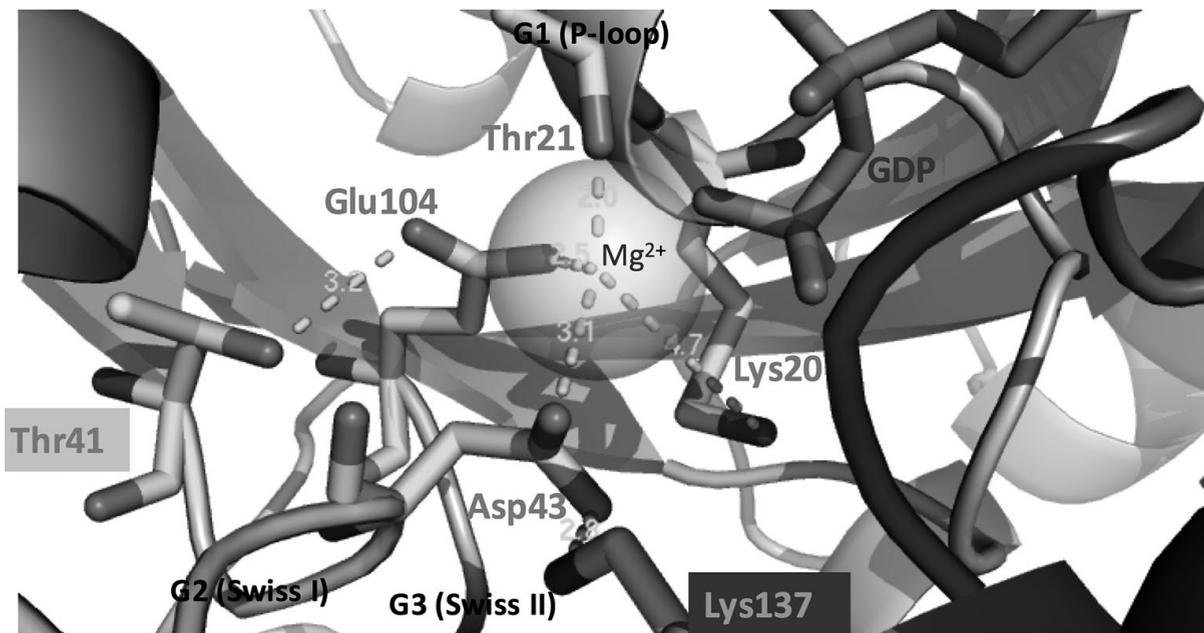


Figura 7. Muestra la conservación de los motivos G1, G2, G3, G4 y G5 en las proteínas UreG bacterianas graficados usando WebLogo.

Subunidad A



Subunidad B

Figura 8. Posibles residuos implicados en la unión de magnesio. El ion metálico se modeló usando como template la posición de ion en el cristal de la enzima de *H. Pilory*: PDB 4LPS mientras que el GDP del PDB 4HI0 Mg²⁺

Residuos UreG *E. coli*

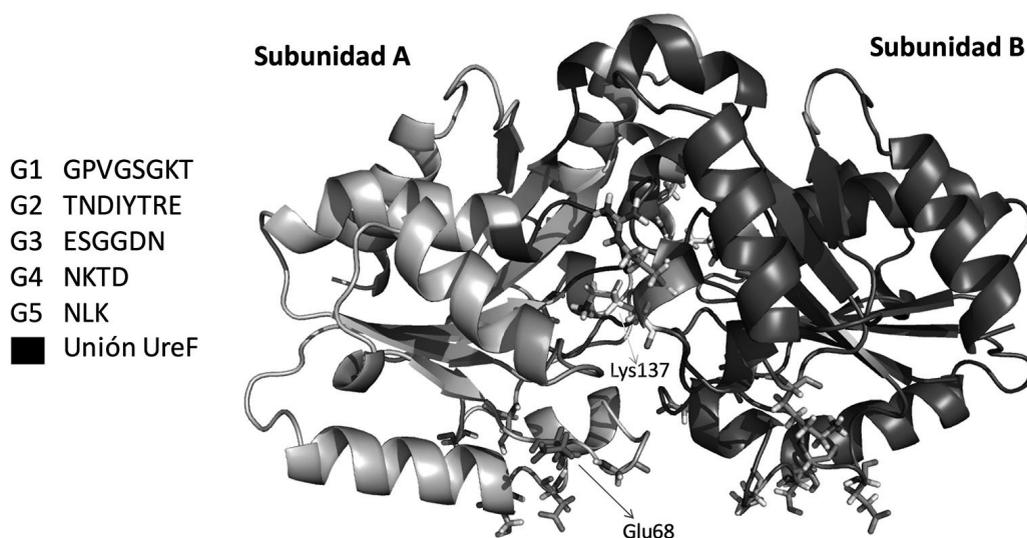


Figura 9. Identificación de motivos G en el dímero de UreG *E. coli*: G1 (residuo 14-21), G2 (residuo 41-48), G3 (residuo 104-109), G4 (residuo 151-154) y G5 (residuo 183-185); señalando posibles residuos implicados en la unión con UreF, identificados mediante alineamiento con el PDB 4HI0.

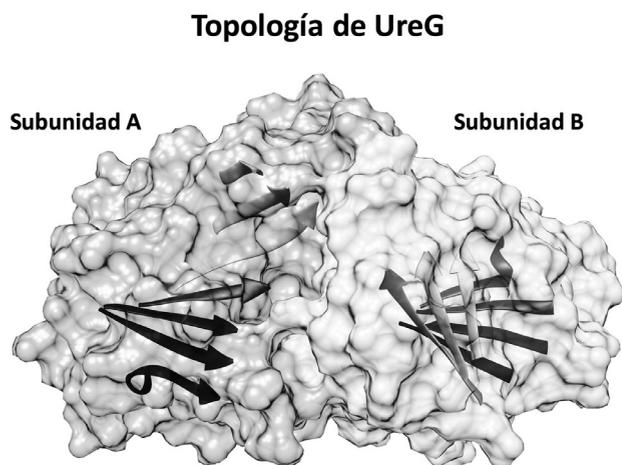


Figura 6. Topología de las hojas β presentes en la estructura tridimensional de UreG. Se muestra la superficie de van der Waals y en cartoon las hebras.

Los análisis estructurales realizados por Zambelli [56], determinaron que las secuencias conservadas de las proteínas UreG predominan en las asas más que en las hebras y hélices, sugiriendo que estas últimas regiones solo son necesarias para conferir la estructura general de la proteína. A partir del alineamiento múltiple de

las secuencias de proteínas UreG bacterianas, se logró determinar la diversificación de importantes motivos conservados presentes en las asas, posiblemente involucrados en la unión de GTP y Ni^{2+} así como en la catálisis y especificidad por el nucleótido; siendo la conservación de los motivos: (1) G1 (P-loop) con secuencia GPVG[S/R]GKT localizado en la región N-terminal, (2) G2 (Swiss I) con secuencia TNDIYT[K/Q/R]E, (3) G3 (Swiss II) con secuencia ESGGDN, (4) G4 con secuencia NK[T/I/S/V]D y (5) G5 con la secuencia más variable [N/D/S/A][L/M/V][K/R/H/S] entre estos motivos (Figura 7).

El motivo P-loop está localizado entre la hebra S1 y hélice H1, situado a un lado de un bucle entre la hebra S4 y S5. Observándose Switch I entre la hebra S2 y hélice H2 mientras que Switch II entre la hebra S4 y S5. Se refiere que los motivos G1, G3, G4 y G5 en la superfamilia de las GTPasas pequeñas son los responsables de reconocimiento, unión e hidrólisis junto con la interacción con el cofactor Mg^{2+} , concordando con el modelo propuesto, determinando que los residuos en EcUreG con alta probabilidad de participar en la unión de Mg^{2+} sean: (1) Lys20, (2) Thr21 presentes en el motivo P-loop, (3) Asp43 en motivo G2 y (4) Glu104 en el motivo G3, mostrados en la Figura 8, donde a la vez se aprecia una posible interacción del residuo Asp43 con Lys137 de la otra subunidad y del residuo Glu104

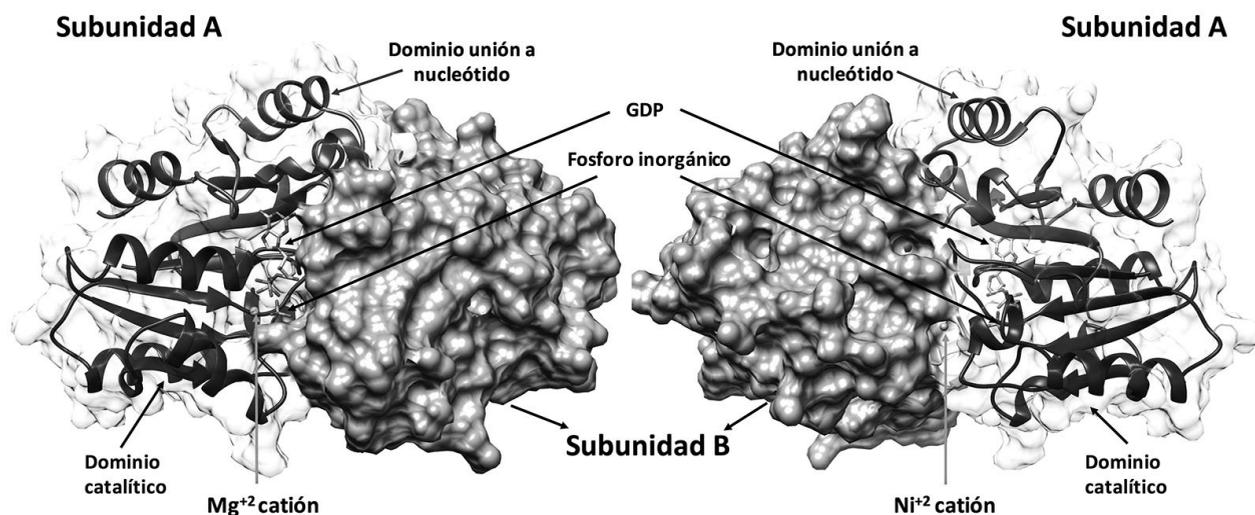


Figura 10. Dominios de unión al ligando GDP-Mg²⁺ y Ni²⁺ los cuales se obtuvieron de su proteína homóloga 4HI0 y 4LPS, respectivamente.

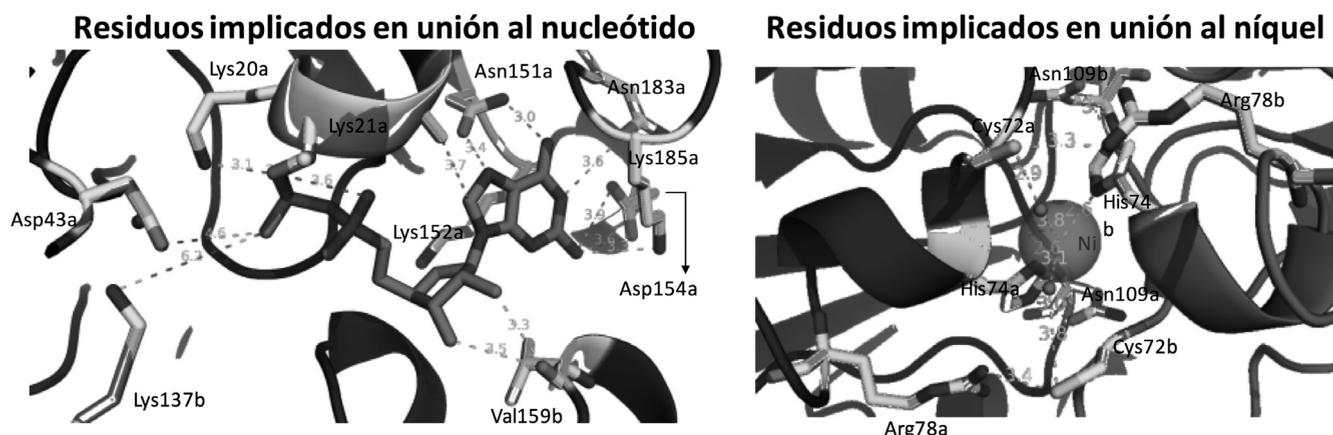


Figura 11. Residuos implicados en la interacción con el nucleótido y níquel, resaltando residuo Lys137 y Val159 como importantes en catálisis e unión respectivamente, así como residuos Arg78 e Asn109 implicados en unión de níquel. El ligando GDP se obtuvo del PDB 4HI0 mientras que Ni y agua del PDB 4LPS.

con Thr41 presente en el motivo G2 (involucrado en la unión a la proteína activadora de GTPasa).

Con base en la importancia del motivo G2, se realizó un alineamiento de los residuos implicados en la unión de UreG con UreF identificados por Fong y colaboradores (2013), apreciando en nuestro modelo que el motivo G2 no participa directamente en la unión con la proteína accesoria UreF como se muestra en la Figura 9, señalando los posibles residuos implicados en esta unión por parte de EcUreG (Glu68, Gly70, Asp80, Ser82, Ser115, Glu117, Arg136, Lys137 y Lys144). A pesar de ello se observó que el motivo G2 está estrechamente ligado con el residuo ácido glutámico 68 (color

rojo) y el residuo lisina 137 (color amarillo), donde el residuo Glu68, presente entre la hebra S3 y hélice H4, y el residuo lisina 137 de la otra subunidad (ubicado en la hélice α 7) siendo posiblemente que interacciones con UreF modifiquen indirectamente el motivo G2 de su conformación original. Lo cual sugiere que la interacción de UreG con UreF, a partir del previo complejo UreD[H]/UreF dado que esta unión modifica aspas flexibles en UreF [44,48], confiriendo un incremento en la actividad GTPasa intrínseca a UreG.

El modelo de UreG permitió identificar dos dominios independientes separados por la hebra S5, siendo uno identificado como dominio de unión a

nucleótido y el otro como dominio catalítico, los cuales se muestran en la Figura 10, junto con los ligando GDP, Mg²⁺ y níquel. La estequiometría de UreG es de dos sitios activos y un sitio de Ni, por lo cual es un dímero obligado para su función biológica como transportador de ión níquel, estando estas cavidades comunicadas de alguna forma.

Los residuos identificados mediante el modelo cuya interacción resulta más probable con el ligando GDP y Ni se muestran en la Figura 11, resaltando Lys137 y Val159 como residuos importantes en la unión del nucleótido así como posiblemente implicado Lys137 en la actividad catalítica. A la vez, en la cavidad de unión a Ni se aprecia que Arg78 e Asn109 son quizá residuos importantes tanto en la unión como en la dimerización de UreG, ya que mantienen estable (posiblemente en dos conformaciones siendo una abierta y otra cerrada) la cavidad de unión a níquel.

El análisis de los residuos implicados en la comunicación entre la cavidad unión a nucleótido y

cavidad unión a metal, permitieron identificar una cavidad extra que hasta la fecha no ha sido reportada. Posiblemente esta cavidad esté involucrada en un aumento de la actividad enzimática por parte de UreG del complejo metalochaperonina (UreG/F/D[H]), permitiendo la entrada de sustratos como bicarbonato, el cual ha sido reportado por Fong y colaboradores (2013) que incrementa la actividad hidrolítica hasta 10 veces. En el modelo propuesto se logró identificar como posibles residuos implicados en la comunicación de las cavidades en la subunidad A: Tyr45, Cys72 e His74 mientras que en la subunidad B: Cys72, His74, Asn109, Ser111 y Lys137 siendo todos, a excepción de Lys137 mostrados en la Figura 12. Estudios de mutagénesis sitio dirigido in silico, no mostrados, sugieren que debe presentarse un cambio conformacional grande que permita la comunicación de los dos sitios, dado que cambios conformacionales individuales de los residuos, no permiten la comunicación de las cavidades.

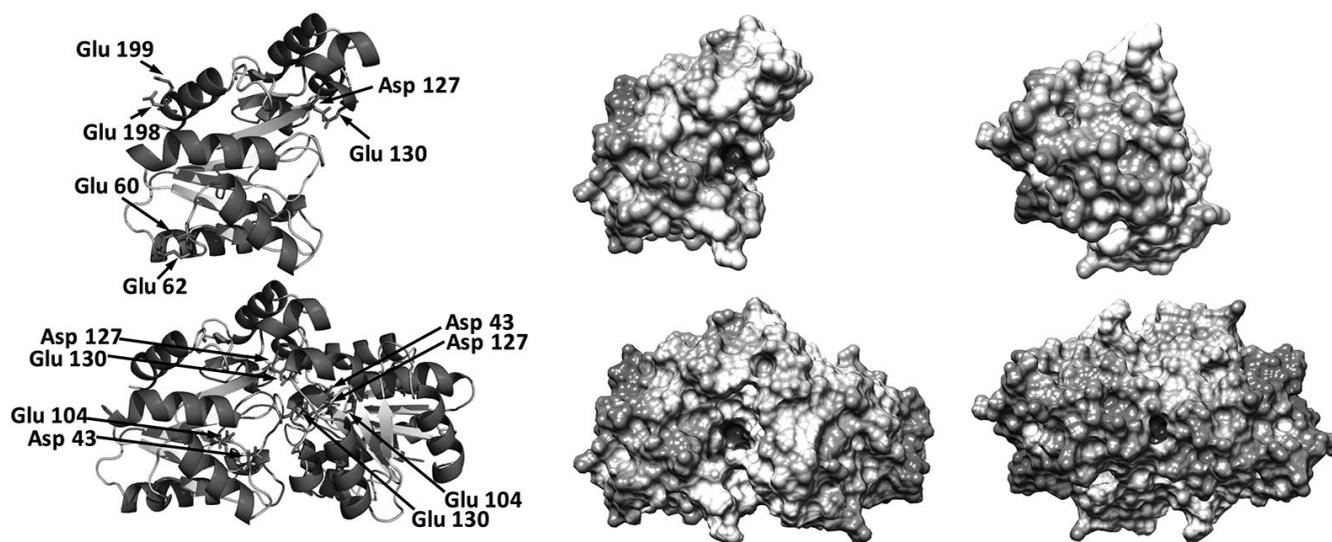


Figura 13. Potencial electrostático molecular superficial UreG de *E. coli*, el monómero representado en la parte superior y el dímero en la parte inferior. A) Se resalta de color morado residuos con pKa calculados mediante Propka fuera del rango de lo normal siendo para el monómero pKa calculados (Glu-60 3.66*; Glu-62 5.88*; Asp-127 3.94*; Glu-130 7.66*; Glu-198 6.12* y Glu-199 3.96*), mientras que el dímero subunidad A (Asp-43 2.9*; Glu-104 7.03*; Asp-127 4* y Glu 130 9.61*) siendo estos muy semejantes a los pKa cálculos en la subunidad dos; a la vez se muestra de color rojo (hélices), en amarillo (hebras) y en verde (loop). B) Muestra la cavidad de unión a GTP. C) Muestra la cavidad de unión a níquel.

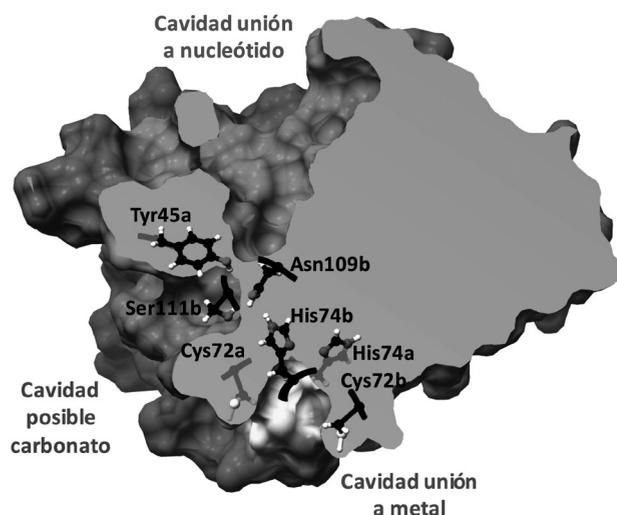


Figura 12. Muestra cavidades apreciables en el modelo de UreG, con posibles residuos implicados en la comunicación las cavidades.

Para obtener mayor información estructural del modelo EcUreG, se calculó el potencial electrostático tanto del monómero como del dímero, por medio del servidor APBS (<http://apbs.org/>) los cuales se muestran en la Figura 13 junto con su respectivo modelado en representación cartoon, resaltando los residuos con pK_a calculados fuera del rango normal, sugiriendo que son posibles residuos importantes de la proteína, resaltando la presencia del residuo Asp43 previamente identificado como residuo implicado en la hidrólisis de GTP, mostrando un pK_a de 2.9, el cual normalmente tiene un pK_a de 3.8 para su cadena radical. El modelo se caracteriza por presentar gran parte de su superficie con carga parcialmente negativa. Como era de esperarse debido a la polaridad negativa del GTP, la cavidad de unión a este presenta carga parcial positiva, mientras que la cavidad de unión a níquel sorprende al tener carga parcial positiva ya que la polaridad del níquel es positiva.

Esto puede ser consecuencia de emplear como templado a UreG de *H. pilory* (PDH 4HI0), el cual es un análogo del complejo E-Q y no del complejo central E-PQ, es decir, que es un análogo en donde se ha disociado el Ni²⁺ donde la carga positiva del sitio de unión al metal es consistente con la fuerza que permite la liberación de este.

DISCUSIÓN

Las ureasa y sus proteínas accesorias son blancos para el control antimicrobiano potenciales. Los inhibidores de la ureasa pueden cloquear la actividad, pero los inhibidores de las proteínas accesorias, en especial de UreG, no solo abatirían la actividad de la enzima, sino que evitan que se active la ureasa. La selección de estos compuestos con propiedades de inhibidores, requiere una comprensión detallada a nivel molecular del funcionamiento de las proteínas. El análisis de la información estructural disponible a la luz de estudios comparativos mediante el uso de estrategias bioinformáticas permite no solo clasificar los datos, sino generar criterios de búsqueda y selección de estos compuestos.

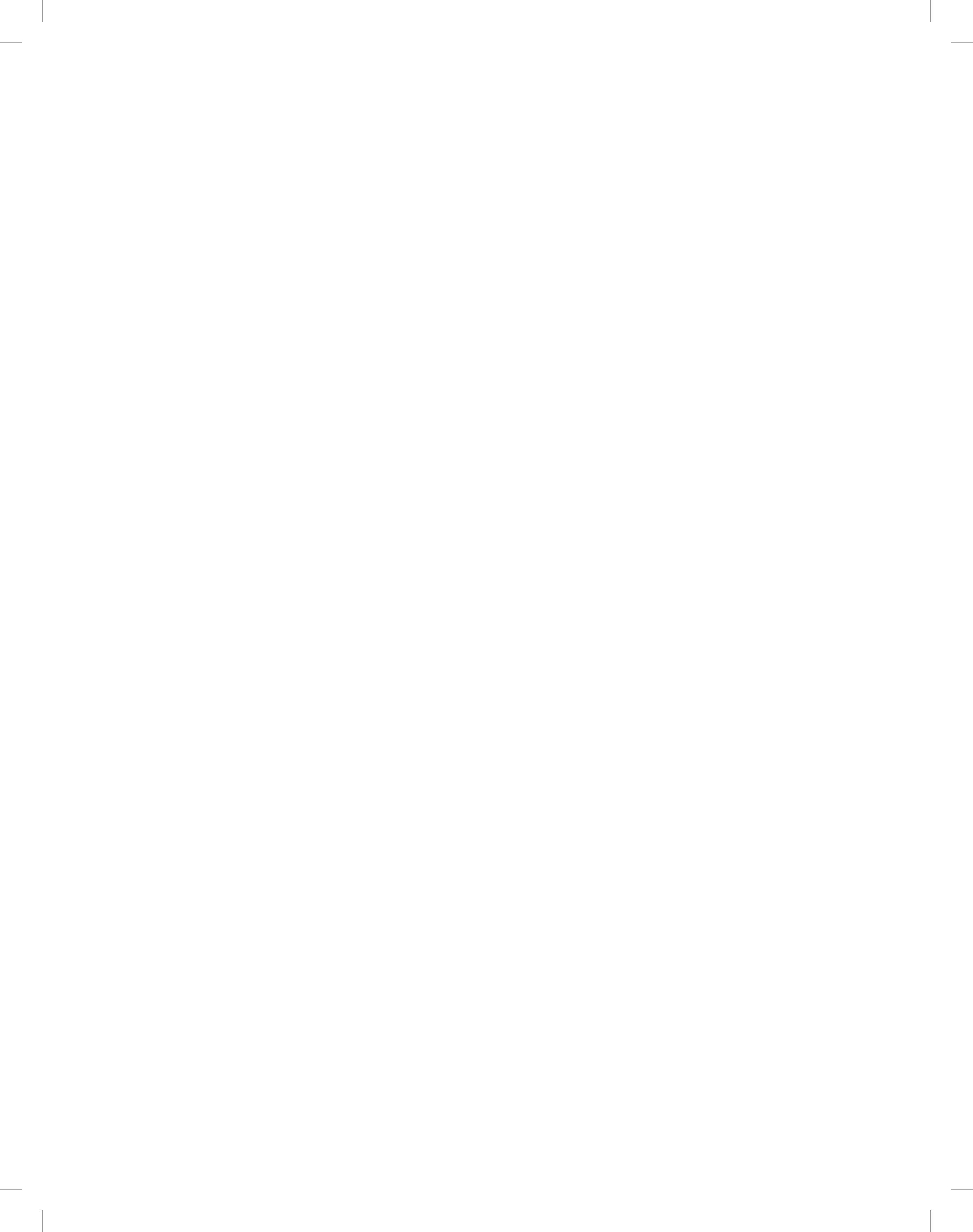
BIBLIOGRAFIA

1. Zalatan, J. G.; Herschlag, D. The far reaches of enzymology. *Nat. Chem. Biol.* 2009, 5, 516–520.
2. McGee, D. J.; Mobley, H. L. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2000, 16, 24–31.
3. Coker, C.; Poore, C. A.; Li, X.; Mobley, H. L. T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect.* 2000, 2, 1497–1505.
4. Mobley, H. L.; Island, M. D.; Hausinger, R. P. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 1995, 59, 451–480.
5. Rutherford, J. C. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathog.* 2014, 10, 1–3.
6. Parsons, C. L.; Stauffer, C.; Mulholland, S. G.; Griffith, D. P. Effect of ammonium on bacterial adherence to bladder transitional epithelium. *J. Urol.* 1984, 132, 365–366.
7. Ebisuno, S.; Komura, T.; Yamagiwa, K.; Ohkawa, T. Urease-induced crystallizations of calcium phosphate and magnesium ammonium phosphate in synthetic urine and human urine. *Urol. Res.* 1997, 25, 263–267.
8. Mobley, H. L.; Hausinger, R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* 1989, 53, 85–108.
9. Foxman, B.; Brown, P. Epidemiology of urinary tract infections: Transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2003, 17, 227–241.
10. Marrs, C. F.; Zhang, L.; Foxman, B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC)

- pathotypes? *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 252, 183–190.
11. Dielubanza, E. J.; Schaeffer, A. J. Urinary tract infections in women. *Med. Clin. North Am.* 2011, 95, 27–41.
 12. Bien, J.; Sokolova, O.; Bozko, P. Role of uropathogenic escherichia coli virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int. J. Nephrol.* 2012, 2012.
 13. Hancock, V.; Ferrières, L.; Klemm, P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious Escherichia coli strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007, 267, 30–37.
 14. Harding, G. K. M.; Ronald, A. R. The management of urinary infections: what have we learned in the past decade? *Int. J. Antimicrob. Agents* 1994, 4, 83–88.
 15. Le, T. P.; Miller, L. G. Empirical therapy for uncomplicated urinary tract infections in an era of increasing antimicrobial resistance: a decision and cost analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33, 615–21.
 16. Molina-López, J.; Aparicio-Ozores, G.; Ribas-Aparicio, R. M.; Gavilanes-Parra, S.; Chávez-Berrocal, M. E.; Hernández-Castro, R.; Ángel Manjarrez-Hernández, H. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic Escherichia coli including O25-ST131 in Mexico City. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011, 5, 840–849.
 17. Peirano, G.; Pitout, J. D. D. Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010, 35, 316–321.
 18. Benini, S.; Rypniewski, W. R.; Wilson, K. S.; Milletti, S.; Ciurli, S.; Mangani, S. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from Bacillus pasteurii: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure* 1999, 7, 205–216.
 19. Benini, S.; Kosikowska, P.; Cianci, M.; Mazzei, L.; Vara, A. G.; Berlicki, Ł.; Ciurli, S. The crystal structure of Sporosarcina pasteurii urease in a complex with citrate provides new hints for inhibitor design. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2013, 18, 391–399.
 20. Krajewska, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2009, 59, 9–21.
 21. Zaborska, W.; Krajewska, B.; Kot, M.; Karcz, W. Quinone-induced inhibition of urease: Elucidation of its mechanisms by probing thiol groups of the enzyme. *Bioorg. Chem.* 2007, 35, 233–242.
 22. Follmer, C. Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *J. Clin. Pathol.* 2010, 63, 424–430.
 23. Modolo, L. V.; de Souza, A. X.; Horta, L. P.; Araujo, D. P.; de Fátima, Â. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *J. Adv. Res.* 2015, 6, 35–44.
 24. Maroney, M. J.; Ciurli, S. Nonredox nickel enzymes. *Chem. Rev.* 2014, 114, 4206–4228.
 25. Follmer, C. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 2008, 69, 18–28.
 26. Sumner, J. B. *The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper.* *J. Biol. Chem.* 1926, 69, 435–441.
 27. Karplus, P. A.; Pearson, M. A.; Hausinger, R. P. 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned? *Acc. Chem. Res.* 1997, 30, 330–337.
 28. Jabri, E.; Carr, M. B.; Hausinger, R. P.; Karplus, P. A. The crystal structure of urease from Klebsiella aerogenes. *Science* 1995, 268, 998–1004.
 29. Ha, N. C.; Oh, S. T.; Sung, J. Y.; Cha, K. A.; Lee, M. H.; Oh, B. H. Supramolecular assembly and acid resistance of Helicobacter pylori urease. *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8, 505–509.
 30. Carter, E. L.; Tronrud, D. E.; Taber, S. R.; Karplus, P. A.; Hausinger, R. P. Iron-containing urease in a pathogenic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011, 108, 13095–13099.
 31. Balasubramanian, A.; Durairajpandian, V.; Elumalai, S.; Mathivanan, N.; Munirajan, A. K.; Ponnuraj, K. Structural and functional studies on urease from pigeon pea (Cajanus cajan). *Int. J. Biol. Macromol.* 2013, 58, 301–9.
 32. Krajewska, B.; van Eldik, R.; Brindell, M. Temperature- and pressure-dependent stopped-flow kinetic studies of jack bean urease. Implications for the catalytic mechanism. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 2012, 17, 1123–1134.
 33. Krajewska, B. A combined temperature-pH study of urease kinetics. Assigning pKa values to ionizable groups of the active site involved in the catalytic reaction. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2016, 124, 70–76.
 34. Roberts, B. P.; Miller, B. R.; Roitberg, A. E.; Merz, K. M. Wide-Open Flaps Are Key to Urease Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134,

- 9934–9937.
35. Macomber, L.; Minkara, M. S.; Hausinger, R. P.; Merz, K. M. J. Reduction of urease activity by interaction with the flap covering the active site. *J. Chem. Inf. Model.* 2015, *55*, 354–361.
 36. Minkara, M. S.; Ucisik, M. N.; Weaver, M. N.; Merz, K. M. Molecular Dynamics Study of *Helicobacter pylori* Urease. *J. Chem. Theory Comput.* 2014, *10*, 1852–1862.
 37. Ciurli, S.; Benini, S.; Rypniewski, W. R.; Wilson, K. S.; Miletti, S.; Mangani, S. Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. *Coord. Chem. Rev.* 1999, *190–192*, 331–355.
 38. Lin, W.; Mathys, V.; Ang, E. L. Y.; Koh, V. H. Q.; Martínez Gómez, J. M.; Ang, M. L. T.; Zainul Rahim, S. Z.; Tan, M. P.; Pethe, K.; Alonso, S. Urease activity represents an alternative pathway for *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen metabolism. *Infect. Immun.* 2012, *80*, 2771–9.
 39. Stingl, K.; Altendorf, K.; Bakker, E. P. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol.* 2002, *10*, 70–74.
 40. Griffith, D. P.; Musher, D. M.; Itin, C. Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. *Invest. Urol.* 1976, *13*, 346–350.
 41. Olivera-Severo, D.; Wassermann, G. E.; Carlini, C. R. Ureasases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2006, *39*, 851–861.
 42. Sinz, A. Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J. Mass Spectrom.* 2003, *38*, 1225–1237.
 43. Farrugia, M. A.; Macomber, L.; Hausinger, R. P. Biosynthesis of the urease metallocenter. *J. Biol. Chem.* 2013, *288*, 13178–13185.
 44. Boer, J. L.; Hausinger, R. P. *Klebsiella aerogenes* UreF: Identification of the UreG binding site and role in enhancing the fidelity of urease activation. *Biochemistry* 2012, *51*, 2298–2308.
 45. Ramsay, K. S. T.; Wafo, P.; Ali, Z.; Khan, A.; Oluyemisi, O. O.; Marasini, B. P.; Khan, I. A.; Bonaventure, N. T.; Choudhary, M. I.; Atta-ur-Rahman Chemical constituents of *Stereospermum acuminatissimum* and their urease and α -chymotrypsin inhibitions. *Fitoterapia* 2012, *83*, 204–8.
 46. Moncrief, M. B. C.; Hausinger, R. P. Characterization of UreG, identification of a UreD-UreF-UreG complex, and evidence suggesting that a nucleotide-binding site in UreG is required for in vivo metallocenter assembly of *Klebsiella aerogenes* urease. *J. Bacteriol.* 1997, *179*, 4081–4086.
 47. Steyert, S. R.; Rasko, D. A.; Kaper, J. B. Functional and phylogenetic analysis of ureD in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2011, *193*, 875–886.
 48. Fong, Y. H.; Wong, H. C.; Yuen, M. H.; Lau, P. H.; Chen, Y. W.; Wong, K. B. Structure of UreG/UreF/UreH Complex Reveals How Urease Accessory Proteins Facilitate Maturation of *Helicobacter pylori* Urease. *PLoS Biol.* 2013, *11*.
 49. Fong, Y. H.; Wong, H. C.; Chuck, C. P.; Chen, Y. W.; Sun, H.; Wong, K. B. Assembly of pre-activation complex for urease maturation in *Helicobacter pylori*: Crystal structure of UreF-UreH protein complex. *J. Biol. Chem.* 2011, *286*, 43241–43249.
 50. Steyert, S. R.; Kaper, J. B. Contribution of urease to colonization by shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2012, *80*, 2589–2600.
 51. Gasper, R.; Meyer, S.; Gotthardt, K.; Sirajuddin, M.; Wittinghofer, A. It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009, *10*, 423–9.
 52. Bourne, H. R.; Sanders, D. A.; McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991, *349*, 117–127.
 53. Gasper, R.; Scrima, A.; Wittinghofer, A. Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *J. Biol. Chem.* 2006, *281*, 27492–27502.
 54. Mehta, N.; Benoit, S.; Maier, R. J. Roles of conserved nucleotide-binding domains in accessory proteins, HypB and UreG, in the maturation of nickel-enzymes required for efficient *Helicobacter pylori* colonization. *Microb. Pathog.* 2003, *35*, 229–234.
 55. Zambelli, B.; Stola, M.; Musiani, F.; De Vriendt, K.; Samyn, B.; Devreese, B.; Van Beeumen, J.; Turano, P.; Dikiy, A.; Bryant, D. A.; Ciurli, S. UreG, a chaperone in the urease assembly process, is an intrinsically unstructured GTPase that specifically binds Zn²⁺. *J. Biol. Chem.*

- 2005, *280*, 4684–4695.
56. Zambelli, B.; Musiani, F.; Savini, M.; Tucker, P.; Ciurli, S. Biochemical studies on *Mycobacterium tuberculosis* UreG and comparative modeling reveal structural and functional conservation among the bacterial UreG family. *Biochemistry* 2007, *46*, 3171–3182.
57. Olson, J. W.; Mehta, N. S.; Maier, R. J. Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 2001, *39*, 176–182.



Las células ganglionares fotorreceptoras

María Magdalena Aldape Castro¹

Leny Judith Álvarez Araujo²

Marisela Baylón Aguilar¹

María Mayela De Lira Carrera¹

Magaly María Escamilla Guerrero³

Jorge Alberto Pérez León^{1,2,4,}*

RESUMEN

Los núcleos supraquiasmáticos (SCN) generan el ritmo circadiano de los mamíferos, este ritmo se sincroniza con la luz ambiental (fotosincronización). La fotosincronización se origina en la retina, pero la ceguera no impide fotosincronizar, algunos estudios pioneros (1920s) encontraron que los ratones ciegos sincronizaban su ritmo al ciclo día/noche. El hecho se explicó por un número de fotorreceptores suficiente para generar el impulso nervioso que se amplificaría en la vía visual. En 1999 se descubrió que los animales sin conos ni bastones fotosincronizan por acción del fotopigmento melanopsina. La expresión y actividad de esta proteína convierte a algunas células ganglionares en fotorreceptoras. Se ha demostrado que tales células (ipRGCs) median la fotosincronización. Aunque son escasas, las ipRGCs son las únicas aferentes a los SCN; entonces la actividad de conos, bastones e ipRGCs forma el impulso nervioso para la fotosincronización, pero las ipRGCs son la vía aferente exclusiva. Es esencial saber cómo las ipRGCs transmiten el impulso a los SCN. Se propone la participación de las ipRGCs en patologías del ciclo sueño vigilia, depresión estacional o depresión mediada por la oscuridad. Es poca la información sobre la interacción sináptica de las ipRGC con el resto de la interneuronas retinianas, tampoco se ha ahondado la expresión del gen de la melanopsina. En nuestro grupo estudiamos a las proteínas sinápticas de las ipRGCs y la expresión del gen de la melanopsina durante la ontogenia. Falta ahondar en estos temas y en la participación de otras proteínas en la fototraducción.

Palabras clave: retina, melanopsina, circadiano, núcleos supraquiasmáticos.

1. Maestría en Ciencias con Orientación Genómica

2. Licenciatura en Química

3. Licenciatura en Biología

4. Doctorado en Ciencias Químico Biológicas. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

* Autor para correspondencia: Anillo Envolvente PRONAF y Estocolmo, cp 31300, Ciudad Juárez Chihuahua. Correo:alberto.perez@uacj.mx
Teléfono (656) 688 18 00, extensiones 1551 y 1564.

INTRODUCCIÓN

La retina es conocida por su participación en la generación del impulso nervioso que desemboca en la traducción sensorial visual; este impulso se genera en los fotorreceptores clásicos, bastones y conos y se modula por las interneuronas retinianas para proyectarse hacia el encéfalo mediante las células ganglionares retinianas (RGC); sin embargo, durante los últimos diez años se ha ampliado la información de las funciones que puede llevar a cabo la retina al descubrirse que existe un subgrupo de RGC que contienen al fotorpigmento melanopsina, capaz de iniciar un proceso de fototraducción homólogo al de la conopsina y la rodopsina (Provencio *et al*, 2012). De esta manera, las RGC con melanopsina actúan como un fotorreceptor adicional a los conos y bastones; se denominan células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) porque responden a estímulos de luz aun cuando sean inhibidas las señales sinápticas provenientes de la red neuronal intrarretiniana, activada por los conos y bastones e incluso una vez que se aíslan de la retina (Hattar *et al*, 2002).

Las ipRGCs son una tercera clase de fotorreceptor en la retina y participan en procesos sin relación con la formación de imágenes que se denominan funciones extra-visuales de la retina, entre ellas las mejor caracterizadas son el reflejo pupilar, la regulación de la secreción de la melatonina y la sincronización de los núcleos supraquiasmáticos para mantener el ritmo circadiano en fase con el ciclo geotérmico (fotosincronización). Se ha descrito la presencia de este tercer tipo de fotorreceptor en la retina de todos los vertebrados, destacando su relevancia por el descubrimiento de un mecanismo de fototraducción alternativo al de conos y bastones, así como por que su actividad explica la fotosincronización que ocurre en animales ciegos (Provencio *et al*, 2012, Lucas, 2013).

Las melanopsina (OPN4) es un receptor acoplado a proteína G activado por la luz, en las ipRGCs se acopla a una proteína Gq y genera fosfoinosítidos como mensajeros intracelulares, por lo que su mecanismo de fototraducción es homólogo al de invertebrados; no obstante, existe controversia acerca de la identidad del efector final. Dado que la OPN4 es una proteína ubicua, presente en diferentes regiones del sistema nervioso e incluso en otros tejidos, es probable que se acople a diferentes mecanismos de fototraducción en diferentes células (Provencio *et al*, 2012, Lucas, 2013, Schmidt, Chen & Hattar, 2011).

Se han descrito cinco subtipos de ipRGCs en el ratón (M1 al M5); y 3 subtipos en la rata (Schmidt, Chen & Hattar, 2011), en ambas especies se demostró que la respuesta intrínseca a la luz difiere significativamente en el tiempo de activación, amplitud y duración entre los diferentes subtipos, y hay datos equivalentes para la retina de un roedor diurno, la rata del Nilo (Karnas *et al*, 2013), por lo que es probable que el mecanismo de fototraducción iniciado por la melanopsina pueda desembocar en efectores finales distintivos de cada subtipo de ipRGC. Hay dos obstáculos esenciales para estudiar el mecanismo de fototraducción: el primero es la escasez de las ipRGCs (2% de la población total de GC), el segundo obstáculo consiste en que podemos identificar a las ipRGC únicamente por marcaje retrógrado tras la inyección de trazadores en el núcleo supraquiasmático (Warren *et al*, 2006). Se ha intentado la alternativa de aislar y cultivar a las ipRGCs con las retinas del pollo (Contín *et al*, 2010) y de la rata (Hartwick, *et al*, 2007), así se ha demostrado la participación de varios mensajeros intracelulares y de posibles efectores finales, entre ellos los canales de calcio activados por voltaje y los canales TRPC6 ó TRPC7 (Hartwick, *et al*, 2007; Perez-Leighton *et al*, 2011).

La investigación sobre las ipRGCs ha producido una numerosa cantidad de evidencias que explican su rol de fotorreceptor extravisual. Los estudios con ratones carentes de conos y bastones ha demostrado que las ipRGCs actúan en conjunto con éstos en la fotosincronización del ritmo circadiano, pero es contundente la evidencia de que únicamente los axones de las ipRGCs proyectan hacia los núcleos supraquiasmáticos por medio del tracto retinohipotalámico (Hatori *et al*, 2008), de modo que, aunque los tres tipos de fotorreceptores pueden participar en la detección de los niveles ambientales de luz, el impulso nervioso es conducido exclusivamente por las ipRGCs (Provencio *et al*, 2012, Lucas, 2013, Schmidt, Chen & Hattar, 2011).

En su papel de neuronas de proyección, las ipRGC presentan dos peculiaridades: la tasa de disparo de potenciales de acción y la frecuencia y amplitud de los potenciales sinápticos es apenas un décimo que la del promedio de las RGC (Pérez-León *et al*, 2006; Wong *et al*, 2007) lo que sugiere que las ipRGCs deben contener un repertorio diferente de canales iónicos, receptores a neurotransmisores y proteínas sinápticas accesorias a los que pueden presentarse en las RGC (Schmidt, Chen &

Hattar, 2011). Los receptores a glicina y a GABA de las ipRGCs del macaco se distribuyen diferencialmente entre las células M1 y M2 (Neumann *et al*, 2011), pero no hay un análisis semejante para la distribución de otros receptores a neurotransmisores. En cuanto a receptores a neuromoduladores, aparte del receptor de dopamina (Van Hook *et al*, 2012), no se ha descrito su presencia en las ipRGCs (revisado por Schmidt, Chen & Hattar, 2011).

DESARROLLO DEL PROYECTO

Las ipRGC representan un tipo fotorreceptor novedoso cuyo mecanismo de fototraducción requiere caracterizarse minuciosamente; así mismo, las interacciones sinápticas de estas células, que no se han descrito, determinan de qué manera transmiten el impulso nervioso responsable de la fotosincronización de los SCN y así, la ritmicidad circádica de los mamíferos. Dada la relevancia de las ipRGC, es también indispensable analizar cómo se regula la expresión de su fotorpigmento, la melanopsina, un aspecto que tampoco se ha estudiado a fondo.

Nuestro proyecto se planteó para caracterizar a los receptores a neurotransmisores, a las proteínas sinápticas, al mecanismo de fototraducción de las ipRGC y a la expresión del gen de la melanopsina en estas células.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Animales

La rata *Rattus norvegicus* raza Wistar y el conejo *Oryctolagus cuniculus* raza New Zealand fueron las especies experimentales, su manejo fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del ICB-UACJ.

Localización de proteínas sinápticas por inmunohistofluorescencia

Para determinar la presencia de diferentes proteínas con relevancia en las sinapsis de las ipRGC se emprendió el análisis de cortes histológicos de las retinas por el método de detección por inmunohistofluorescencia, el método está descrito minuciosamente por Aldape-Castro (2012). En síntesis, en éste los cortes histológicos de la retina se exponen a un anticuerpo primario que reconoce a la proteína de interés, el anticuerpo primario se detecta por la interacción con un anticuerpo secundario que está unido a un fluoróforo; en cada experimento expusimos a los cortes de retina a dos anticuerpos primarios, uno dirigido contra la melanopsina y otro contra la proteína sináptica a analizar; luego se expuso

el tejido a los anticuerpos secundarios adecuados conjugados a fluoróforos diferentes. Los cortes se analizaron por microscopía de epifluorescencia y se adquirieron imágenes por computadora, las que se procesaron posteriormente para ajustar el brillo y contraste.

Los cortes histológicos se obtuvieron de retinas fijadas con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos, que se procesaron en un microtomo de congelación (criostato) para obtener cortes de 12 micrómetros de grosor.

Se usó un anticuerpo para cada unas de las siguientes proteínas sinápticas:

- la melanopsina,
- la subunidad alfa del receptor de glicina,
- las subunidades alfa y beta del receptor de glicina,
- la subunidad alfa del receptor GABA_A,
- las subunidades tipo AMPA 2,3 del receptor de ácido glutámico,
- la proteína Bassoon,
- la proteína gefirina,
- la proteína Thy1,
- la proteínas sináptica PSD95,
- el transportador vesicular de ácido glutámico vGlut1,
- la proteína Calbindina

Todos los anticuerpos fueron comprados de empresas que han validado su funcionamiento en la técnica de inmunohistofluorescencia.

Cuantificación de los transcritos de melanopsina en la retina del conejo.

Como un análisis inicial de la regulación de la expresión del gen de la melanopsina, cuantificamos la cantidad de transcritos de este gen a lo largo de la ontogenia del conejo. Elegimos a esta especie por que los gazapos presentan un cambio de sincronización por alimentación durante la lactancia, a la fotosincronización luego del destete, y este régimen puede proporcionar indicios de correlación entre los eventos de la ontogenia y la variación de la expresión del gen de la melanopsina. El desarrollo experimental está descrito por de Lira Carrera (2012), en síntesis el método fue el siguiente.

Sacrificamos a gazapos de entre 1 y 47 días de edad, aislamos la retina y del tejido extrajimos el ARN mensajero; mediante retro-transcripción obtuvimos el ADN complementario y a partir de éste

realizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde de síntesis un par de cebadores diseñados por nosotros. El fragmento de ADN amplificado se caracterizó por clonación y secuenciación como una secuencia del gen de melanopsina del conejo. Con los mismos cebadores se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa en la modalidad cuantitativa ó de tiempo real (qPCR) utilizando las muestras de ARN de la retina del conejo a diferentes edades.

RESULTADOS

Localización de proteínas sinápticas en las ipRGC por inmunohistofluorescencia

Existen 3 tipos morfológicos de ipRGCs: M1, con dendritas en la sublámina OFF de la capa plexiforme interna (CPI), y cuyo soma puede presentarse en la capa de células ganglionares (GCL) ó en la capa nuclear interna (CNI); M2, que ramifican en la sublámina ON de la CPI, de soma localizado siempre en la GCL, y las M3, que ramifican en ambas subláminas y que tienen el soma en la GCL. La descripción siguiente incluye una correlación de los datos con los subtipos morfológicos:

- A) El RGly y las ipRGCs.- Las subunidad alfa1RGly no co-localizó con las ipRGC en ningún caso, lo que representó un dato inesperado, ya que aquella subunidad forma parte del RGly en el resto de las regiones del sistema nervioso (Betz & Laube, 2006); las subunidades alfa2, 3, 4 y beta, co-localizan en diferente grado, tanto en ipRGC M1 y M2. Hay una distinción entre ipRGC con abundante co-localización (más de 50 puntos de co-localización/cél) y con baja co-localización. La distribución es diferente en las ganglionares típicas (GC), células en que las subunidades del RGly que co-localizan incluyen a la alfa1, con más de 50 puntos/cél (figs 1 y 2).
- B) Receptor GABAa.- En las ipRGCs encontramos la distribución de la subunidad alfa1 del GABAaR en todas las células analizadas, tanto en el soma como en las dendritas de las ipRGCs tipo M1.
- C) Las subunidades AMPA2,3 del receptor de glutamato se encontraron en el soma de todas las ipRGCs analizadas, pero no en las dendritas.

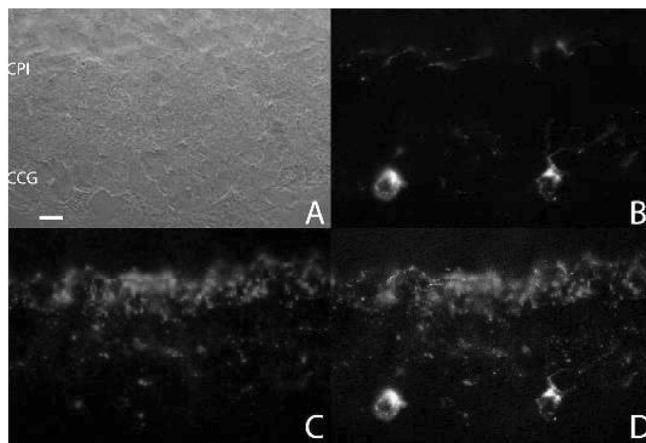


Figura 1. Corte vertical de la retina procesado por inmunofluorescencia con los anticuerpos antiRGly α 1 (rojo) y pAbOPN4 (verde). A, iluminación de Nomarsky sobre la capa de células ganglionares (CCG) y la capa plexiforme interna (CPI). B, marcaje con pAbOPN4 sobre dos células en la CCG. C, antiRGly α 1 marcando exclusivamente la subunidad α 1 del RGly observándose como una banda de puntos en la CPI. En D, se observa que no existe una co-localización entre la subunidad RGly α 1 y las células con OPN4. Reglilla. 10 μ m

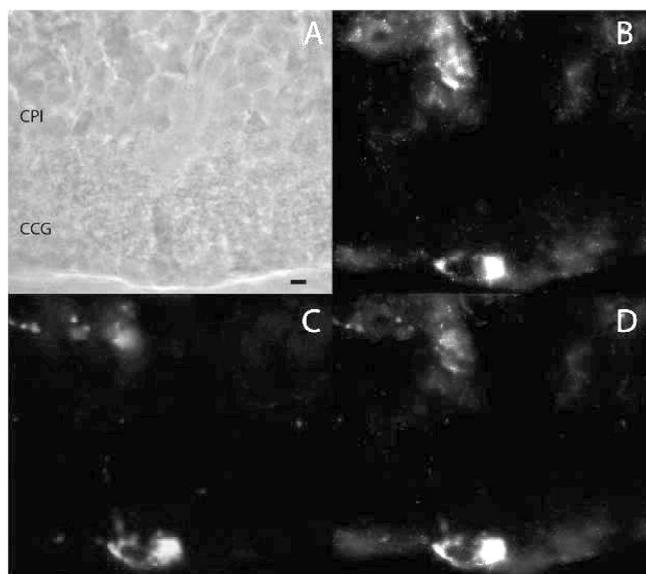


Figura 2. Co-localización abundante de las células con OPN4 y RGly α 1-4 y β . Corte vertical de la retina, inmunofluorescencia contra las subunidades RGly α 1-4 y β , y OPN4. A Iluminación de Nomarsky exponiendo la CCG y la CPI. B Subunidades α 1-4 y β del RGly en la CCG y escaso marcaje en la CPI. En C se observa una célula con OPN4. D Co-localización entre las subunidades α 1-4 y β del RGly y la OPN4. Reglilla 5 μ m.

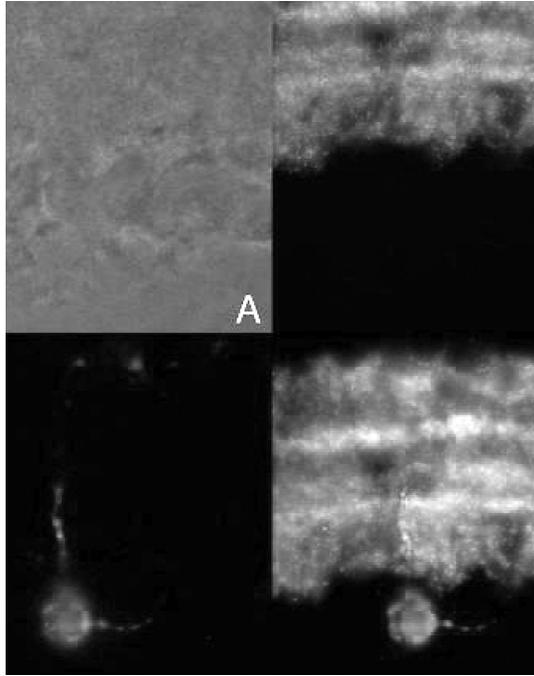


Figura 3. Co-localización abundante de las células con OPN4 y la proteína Bassoon. Corte vertical de la retina, inmunofluorescencia con los anticuerpos contra Bassoon (verde) y OPN4 (rojo). A, Iluminación tipo Normarsky. B, se muestra la proteína Bassoon distribuida por toda la CPI. C, Célula con OPN4 tipo M1, en donde se logra apreciar las dendritas una hacia la CPI y otra en la CCG. D se muestra la co-localización de la célula M1 y la proteína Bassoon. Reglilla 5 μ m.

- D) La distribución de Bassoon (proteína de pre-sinapsis GABAérgicas en la CPI de la retina, Brandstätter *et al*, 1999) entre las ipRGCs es diferencial. Las M1 tienen de 10 a 50 puntos de co-localización; las M2 presentan entre 0 a 10 puntos. Esto indica que los subtipos de ipRGCs tienen un número distintivo de aferencias GABAérgicas, y por lo tanto están sujetos a una aferencia GABAérgica diferencial y en consecuencia a una diferente modulación inhibitoria por la red sináptica retiniana (fig. 3).
- E) La proteína Thy1, es una glucoproteína de membrana plasmática descrita originalmente en los timocitos; en la retina Thy1 se localiza en las células ganglionares, por lo que se ha utilizado como un marcador molecular para este tipo neuronal (Barnstable *et al*, 1984). La población analizada de ipRGCs (que incluye a los subtipos M1 y M2) tiene una co-localización restringida con Thy1, de 0 a 25 puntos/cel; en comparación, las GC tienen una ma-

yor abundancia de co-localización con Thy1, de 15 a 50 puntos/célula. Al presentar esta distribución diferencial de la proteína Thy1, las ipRGCs suman una evidencia adicional de ser un subtipo especial de células ganglionares. Este es un resultado no esperado, dado que la proteína Thy1 se ha propuesto como un elemento molecular uniforme en todas las células ganglionares (fig. 4).

- F) Se analizó la distribución de las proteínas sinápticas PSD95 y vGlut1, distintivas de las sinapsis glutamatérgicas (Sheng, 2001) en el resto del sistema nervioso, dentro de las ipRGCs en la retina de la rata. Ninguna de las dos co-localizó con la melanopsina en las ipRGC.

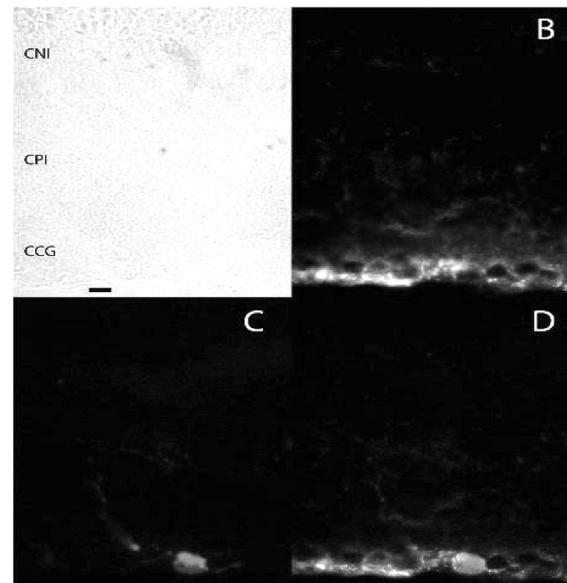


Figura 4. Corte vertical de la retina inmunofluorescencia con los anticuerpos contra Thy-1 y pAbOPN4. A, iluminación de Normarsky. B, Thy-1 se observa en la CCG sobre la membrana de las células ganglionares. C, Célula con OPN4, la dendrita principal se dirige hacia la CPI (M1). D, Obsérvese la co-localización escasa entre la M1 y Thy1 con respecto al resto de las células ganglionares. Reglilla 10 μ m.

Hemos extendido estos resultados al analizar la distribución de la melanopsina durante la ontogenia de la rata. Así, describimos los cambios que presentan la población de células con melanopsina, que estratifican durante la etapa postnatal en la retina. Una de las características más evidentes es el tamaño de la población, el cual disminuye conforme

a la edad. Además se encontró que las dendritas ya están estratificadas a partir de P4, en la sublámina ON de la IPL y el otro en la OFF. Fueron encontradas células con dendritas en ambas de estas subláminas histológicas (biestratificadas, las cuales coinciden con las células M3 del ratón), así como células monoestratificadas para cada sublámina (M1 y M2). Una porción de las células positivas a melanopsina tienen una cantidad notablemente menor de esta proteína, y algunas de estas células tienen un soma notablemente más grande.

Además de las células con melanopsina que se localizan en la capa de células ganglionares, se encontró que en edades de P4 a P8 algunas células localizadas en capas diferentes presentan melanopsina en pequeñas cantidades. Las células horizontales, identificadas por medio del anticuerpo contra la proteína de unión a Ca^{++} llamada calbindina (Haverkamp & Wässle, 2000), tuvieron inmunorreactividad en el soma. Este hecho fue confirmado mediante el uso de dos anticuerpos que reconocen a la melanopsina (Provencio *et al*, 1998).

El número de células que presentaron melanopsina en co-localización con Thy-1 fue mínimo durante las edades postnatales estudiadas, que van de P3 a P13. Todos estos datos indican que la melanopsina es ubicua durante el desarrollo e incluso sugieren que puede haber tipos neuronales retinianos diferentes a la población de GC dentro de los cuales la melanopsina sea una proteína funcional.

RESULTADOS

Expresión del gen de melanopsina en la retina del conejo durante la ontogenia

El conejo es una especie que durante la etapa perinatal sincroniza el ritmo circadiano con el horario de alimentación materna (sincronización por alimento), después del destete los juveniles empiezan sincronizar el ritmo circadiano con el ciclo geotérmico (fotosincronización) (Juárez *et al*, 2010). En la retina del conejo medimos los transcritos de OPN4 durante la ontogenia, utilizando la cuantificación de los transcritos de Thy1 como patrón para las células ganglionares y del gen de GAPDH como gen constitutivo. La máxima expresión de los genes en el desarrollo temprano se da en P4, mientras que después del destete (P30) la mayor expresión de OPN4 es en P47 con 7.33×10^4 copias/ μ L de cDNA, a los 60 días la expresión baja a un 4.91×10^4 y en P120 tiene un valor de 1.22×10^3 . La expresión del gen OPN4 va

en decremento conforme avanza la edad del conejo. La dinámica de la expresión de GAPDH y Thy-1 es de una disminución constante a lo largo de la ontogenia, sin presentar un pico correlacionado como el que tiene OPN4 en P47. Con base en estos datos, proponemos que en P47 se da la señal para el cambio de sincronización por alimento a fotosincronización, mediado este mecanismo por la melanopsina y la consecuente fototraducción y señalización de las ipRGC (fig. 5).

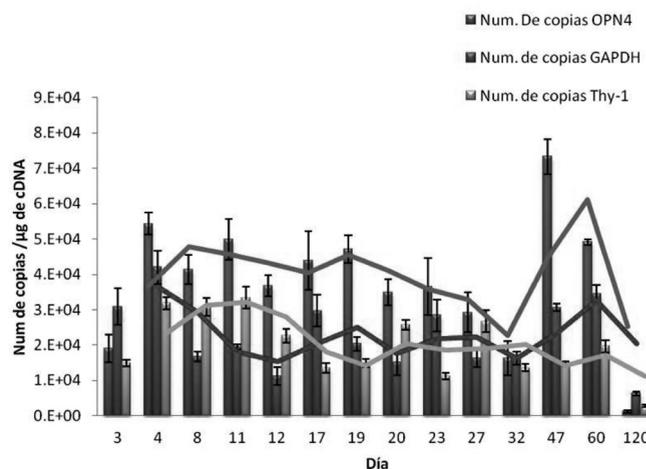


Figura 5. Cuantificación de la expresión de los genes OPN4, GAPDH y Thy-1 en la retina de conejo durante la ontogenia. OPN4 tiene una expresión más alta que GAPDH, Thy-1 tiene una expresión mucho menor que los genes anteriores.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Mediante experimentos de inmunohistofluorescencia en cortes de retina y en retina completa encontramos que las subunidades del receptor postsináptico de glicina no se distribuyen homogéneamente entre las ipRGC, en cambio, encontramos a la subunidad α del receptor GABA_A en todas las ipRGCs y a las subunidades tipo AMPA 2,3 del receptor de ácido glutámico. En cuanto a las proteínas sinápticas, la proteína Bassoon, característica de las sinapsis retinianas tampoco se distribuye homogéneamente entre las ipRGCs, al igual que la proteína gefirina, que en las sinapsis glicinérgicas tanto de la retina como del sistema nervioso se asocia con el receptor de glicina y con el receptor de GABA_A (Tyagarajan y Fritschy, 2014).

Durante la realización del proyecto precedente, la localización de la proteína Thy1, que es una proteína marcadora de células ganglionares retinianas,

también resultó ser heterogénea entre las ipRGCs. Repetimos toda esta serie de experimentos en animales durante la ontogenia, encontrando esencialmente la distribución heterogénea de los receptores a neurotransmisores y de las proteínas sinápticas. Surgió un dato adicional muy relevante: algunas células con melanopsina en los neonatos contienen a la proteína calbindina, característica de las células horizontales; se ha publicado que en las retinas de la carpa, del pez cebra y del pollo la OPN4 se distribuye, además de las ipRGCs, en las células bipolares y en las células horizontales³. Tales hallazgos abren la posibilidad de que varias cohortes celulares expresen a la OPN4 y en consecuencia que existan otros fotorreceptores retinianos basados en la fototraducción por este fotopigmento.

De los datos en la literatura y de nuestro proyecto concluimos que los diferentes tipos morfológicos de ipRGCs difieren también en el repertorio de proteínas sinápticas (receptores a neurotransmisores, a neuromoduladores, proteínas sinápticas accesorias, canales iónicos) y de moléculas que participan en la cascada de fototraducción. Además, hay una dinámica de expresión de melanopsina a lo largo de la ontogenia, por lo que surge la necesidad de caracterizar tales aspectos

La caracterización de los receptores a neurotransmisores y las proteínas sinápticas está cubriendo el aspecto molecular de la fisiología de las ipRGCs; pese a los numerosos estudios sobre las respuestas de las ipRGCs (Schmidt *et al*, 2011), no hay una descripción de las proteínas sinápticas de estas células ni de su comparación con las GC normales. En cuanto al desarrollo ontogénico, describimos también por vez primera, la localización de la melanopsina en tipos neuronales diferentes a las células ganglionares en la etapa perinatal de la rata. La evidencia de que varios tipos neuronales expresan transitoriamente a la melanopsina durante el desarrollo, sugiere que esta proteína participa en los procesos iniciales de la ontogenia, una sugerencia que vale la pena evaluar experimentalmente.

La descripción de la expresión del gen de melanopsina durante la ontogenia del conejo es el primer estudio del fotopigmento en esta especie, que es peculiarmente relevante para la Cronobiología por que muestra desvío ontogénico entre sincronización por alimentación maternal a fotosincronización. Aunque se ha descrito el desarrollo conductual de los gazapos y la participación de diversos núcleos encefálicos en la sincronización circádica,

en esta especie hay escasos datos sobre el papel de la retina ó de las ipRGCs en este mecanismo esencial de la regulación metabólica; es así un área de estudio en la que puede contribuirse con evidencias sobre la actividad de este subtipo tan peculiar de células ganglionares.

Sin duda estos dos planteamientos reflejan el hecho de que las ipRGCs representan una nueva brecha en la investigación en las neurociencias; los datos recabados en la última década han llevado a la conclusión de que la fotodetección es un proceso con muchos mayores beneficios que sobrepasan a la información visual.

REFERENCIAS

- Aldape Castro MM (2012) Localización por inmunohistofluorescencia de los receptores a neurotransmisores presentes en las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) en retina de rata. Tesis Maestría en Ciencias Orientación Genómica, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- Barnstable, C.J.; Dräger, U.C. (1984). Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience*. 11(4): 847-855
- Berson D, Dunn F, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002; 295 1070-1073
- Betz H, Laube B (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *Journal of Neurochemistry* 97, 1600-1610.
- Brandstätter JH, Fletcher EL, Garner CC, Gundelfinger ED & Wässle H (1999) Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *European Journal of Neuroscience*, 11 3683-3693.
- Contín MA, Verra DM, Salvador G, Ilincheta M, Giusto NM, Guido ME. Light activation of the phosphoinositide cycle in intrinsically photosensitive chicken retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:5491-5498.
- Hatori, Le, Vollmers, Keding, Tanaka, Schmedt, Timothy Jegla, & Panda (2008) Inducible Ablation of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells Reveals Their Central Role in Non-Image Forming Visual Responses. *PloS ONE*, 3(6), e2451.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. (2002). Melanopsin-containing reti-

- nal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*. 295(5557):1065-70.
- Hartwick AT, Bramley JR, Yu J, Stevens KT, Allen CN, Baldrige WH, et al. Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 2007;27:13468-13480.
- Haverkamp S. y Wässle H (2000) Immunocytochemical Analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol*. 424:1-23.
- Juárez C, Morgado E, Meza E, Waliszewskib SM, Aguilar-Roblero R & Caba M (2013) Development of retinal projections and response to photic input in the suprachiasmatic nucleus of New Zealand White Rabbits. *Brain Research*, 1499:21–28.
- Karnas D, Hicks D, Mordel J, Pévet P, Meissl H (2013) Intrinsic Photosensitive Retinal Ganglion Cells in the Diurnal Rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *PLoS ONE* 8(8): e73343.
- Lira Carrera, de MM (2012). Expresión del gen de la melanopsina en la retina del conejo. Tesis Maestría en Ciencias Orientación Genómica, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez
- Lucas RJ. Mammalian inner retinal photoreception. *Curr Biol*. 2013;23:R125-R133.
- Neumann S.; Haverkamp S. y Auferkorte ON (2011). Intrinsically photosensitive ganglion cells of the primate retina express distinct combination of inhibitory neurotransmitter receptors. *Neuroscience*. 19924-31.
- Perez-Leighton CE, Schmidt TM, Abramowitz J, Birnbaumer L, Kofuji P. Intrinsic phototransduction persists in melanopsin-expressing ganglion cells lacking diacylglycerol-sensitive TRPC subunits. *European Journal of Neuroscience*. 2011;33:856-867.
- Perez-Leon JA, Warren E, Allen CN, Robinson DW & Brown RL. (2006) Synaptic Inputs to Retinal Ganglion Cells that Set the Circadian Clock, *European Journal of Neuroscience*, 24:1117-1123.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD (1998) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:340-345
- Provencio I, Warthen D. (2012) Melanopsin, the photopigment of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*.1:228-237.
- Schmidt TM, Chen S-K, Hattar S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci*. 2011;34:572-580.
- Sheng M (2001) Molecular organization of the postsynaptic Specialization. *Proc. Natl Acad Sci USA*., 98 7058–7061.
- Tyagarajan SK & Fritschy J-M (2014) Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat. Rev Neurosci.*, 15: 141-156.
- Van Hook, M, Wong,; Berson, DM. (2012) Dopaminergic modulation of ganglion cell- photoreceptors in rat. *FEBS letters*. 35, 507-518
- Warren E, Allen CN, Robinson DW & Brown RL. (2006) The light-activated signalling pathway in SCN-projecting rat retinal ganglion cells. *European Journal of Neuroscience*, 23:2477-2487.
- Wong KY, Dunn FA, Graham DM & Berson D (2007) Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J Physiol* 582(Pt 1): 279-96.

DetECCIÓN de *Streptococcus agalactiae* a partir de aislamientos y muestras clínicas en mujeres embarazadas que acuden a los hospitales en Ciudad Juárez

Jesús Angel Araujo González^{1*}
David Reyes Ruvalcaba²
Nadia Hernández Urista^{1,3}

RESUMEN

El *Streptococcus agalactiae* beta hemolítico del grupo B (*S. agalactiae*) es un constituyente de la microbiota nativa de vagina, uretra, etcétera. Esta bacteria es reconocida por causar infecciones en mujeres embarazadas y puede ser mortal para el recién nacido. Las mujeres gestantes pueden cursar asintomáticas, y transmitir el microorganismo a sus hijos a través del canal del parto, existiendo el riesgo de causar neumonía, sepsis o meningitis. Las cuales tienen alto índice de mortalidad.

Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, han implementado estrategias basadas en estudios poblacionales, recomendando realizar tamizajes para la colonización vaginal por *S. agalactiae* mediante cultivo y/o detección molecular entre la semana 35 y 37 de gestación; seguido de profilaxis, cuando se requiera.

México es uno de los países que no realiza este tamizaje. Estadísticas de otros países latinoamericanos reportan una prevalencia significativamente menor de colonización bacteriana. Por tanto, es importante conocer nuestras estadísticas de prevalencia materna por *S. agalactiae* en Ciudad Juárez para planear estrategias que reduzcan la morbilidad y mortalidad neonatal en su caso. El presente trabajo utiliza la herramienta de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para su detección. El objetivo es reconocer la importancia de este método y en un tiempo prudente implementarlo en hospitales de la ciudad para un mejor diagnóstico.

Palabras clave. PCR, *S. agalactiae*, beta hemólisis, meningitis.

1. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Programa de Química, jaraujo@uacj.mx, tel. 6566881894.
 2. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Depto. Ciencias de la Salud, dreyes@uacj.mx.
 3. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Programa de Química.
- * Autor para correspondencia.

INTRODUCCIÓN.

El *S. agalactiae*, denominado generalmente en la literatura como Estreptococo beta hemolítico del Grupo B (EGB), es un diplococo Gram positivo, con cápsula, anaerobio facultativo, catalasa negativo, que producen β hemólisis y crece bien en medios de cultivo enriquecidos (Larcher *et al.*, 2005). Se presenta en pares o formando cadenas cortas y se caracteriza por la presencia del antígeno polisacárido B de Lancefield y antígenos proteicos. El antígeno del grupo B está compuesto por el polisacárido ramnosa-glucosamina (Winn *et al.*, 2006) y estas características permiten su clasificación en serotipos. Rebeca Lancefield clasificó a los estreptococos por el antígeno polisacárido en la pared celular o antígeno de grupo, que se basa en su capacidad para producir hemólisis. Esta bacteria posee una cápsula, en la cual se han identificado hasta 9 serotipos diferentes Ia, Ib, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX, que permiten la vigilancia epidemiológica del microorganismo (Romero Cabello, 2007). Los nueve serotipos capsulares contienen glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, ácido *N-Acetilneuramínico* (ácido siálico); (Winn *et al.*, 2005) en forma de residuos de cadena lateral y terminal (Ryan y Ray, 2005). El serotipo III es la causa predominante de meningitis neonatal por EGB (Glaser *et al.*, 2002).

El *S. agalactiae* fue aislado por primera vez de muestras bovinas en 1887, siendo de importancia como agente etiológico de mastitis en el ganado bovino. Después de casi un siglo, el microorganismo se encontró en cultivos vaginales de púerperas en 1935 (López García *et al.*, 2012). En el siglo XX Hugo Schottmuller demostró la producción de la hemólisis por ciertos estreptococos en agar sangre y luego de unos años, J. H. Brown describió las diferentes reacciones hemolíticas de los estreptococos por primera vez y, asimismo, las clasificó como alfa, beta y gamma (Koneman *et al.*, 1998).

El *S. agalactiae* forma parte de la microbiota normal del tracto digestivo y genitourinarias, a partir de este, coloniza la vagina pudiéndose transmitir al recién nacido a su paso por el canal del parto. El *S. agalactiae* fue descrito como causa de sepsis puerperal en 1938 y su importancia como patógeno capaz de producir infección en la madre y en el recién nacido, se puso de manifiesto en 1960. En la década de los setenta se observó un incremento en la frecuencia de sepsis y meningitis neonatal causada por este microorganismo (Cabero *et al.*, 2007).

Los principales métodos que se utilizan para la identificación presuntiva del *S. agalactiae* son mediante criterios fenotípicos, basándose en las características físicas y metabólicas que presenta la bacteria. Estas características se refieren a la morfología microscópica mediante tinciones, morfología macroscópica de la colonia como las reacciones hemolíticas en gelosa sangre de carnero, la resistencia antimicrobiana y propiedades metabólicas como la detección del factor CAMP y la hidrólisis de hipurato (Forbes *et al.*, 2009).

Los estreptococos se dividen en diferentes grupos por sus propiedades hemolíticas, ya que al ser cultivados con fines diagnósticos para su identificación inicial, se siembran en un medio de gelosa sangre y luego de su periodo de incubación se puede observar el efecto del crecimiento de las bacterias sobre los eritrocitos del medio de cultivo. Las colonias del *S. agalactiae* del grupo B, se observan rodeadas por un halo transparente, debido a la lisis de los eritrocitos y se considera como un halo de beta hemólisis (Figura 1). La estreptolisina es una enzima que produce la bacteria y causa la lisis completa de los eritrocitos. Hay dos tipos de estreptolisinas, la O y la S, esta última es estable con el oxígeno produciendo una hemólisis neta de distinto grado, no es antigénica y por tanto no estimula la respuesta inmunológica. Por otro lado la estreptolisina O es antigénica pero sensible al oxígeno, tiene afinidad por el colesterol de la membrana eritrocitaria y de esta manera produce agujeros en las células, provocando la lisis completa (Koneman *et al.*, 1998).

Los estreptococos tienen un metabolismo fermentativo de glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa y ácido láctico (Romero Cabello, 2007). Carecen de la enzima hemínico catalasa, las cuales no se presentan en bacterias del ácido láctico; la prueba de la catalasa consiste en observar el desprendimiento de oxígeno gaseoso mediante peróxido de hidrogeno (Parés y Juárez, 1997). El *S. agalactiae* pertenece al orden *Lactobacillales* por producir ácido láctico como se mencionó anteriormente, es su único producto de fermentación y por tanto no producen endosporas y son inmóviles. La energía la obtienen mediante la fosforilación de sustrato más que por la cadena de electrones y la fosforilación oxidativa ya que carecen de citocromos. Asimismo, dependen de la fermentación de azúcares para obtener energía. La fermentación la realiza por la vía de Embden-Meyerhof o producen la fermentación heteroláctica por la vía de las pentosas fosfato (Prescott *et al.*, 2002).

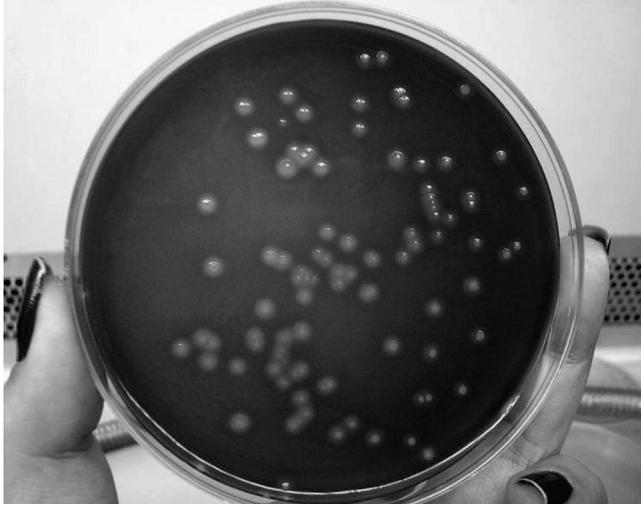


Figura 1. Presencia de β -hemolisis por *S. agalactiae* en gelosa sangre, se observa una lisis completa de glóbulos rojos, con un halo transparente alrededor de las colonias (Escobar, 2014).

Las prueba más usada para la identificación de estreptococos β -hemolíticos del grupo B, es la prueba de CAMP que deriva su nombre de las iniciales de los tres investigadores que determinaron el fenómeno en 1944 (Christie, Atkins y Munich-Petersen) (Rodríguez Cavallini *et al.*, 2005). El factor CAMP se refiere a la producción de una proteína difusible extracelular y termoestable que se presenta en los estreptococos del grupo B, que con la presencia de la β -lisina o β -estafilosina que es una esfingomielinasa C del *Staphylococcus aureus* dan una hemolisis sinérgica. La prueba se realiza en un agar sangre, en donde se siembra el *Staphylococcus aureus* de forma perpendicular a la línea de siembra del estreptococo en estudio y es lisada la esfingomielina presente en la membrana de los eritrocitos bovinos u ovinos (Figura 2); (Denamiel *et al.*, 2013). Otra prueba bioquímica es la hidrólisis del hipurato, en este caso el *S. agalactiae* presenta la enzima hipuricasa, que es capaz de hidrolizar el sustrato hipurato sódico con la formación de benzoato de sodio y glicina. Esta reacción puede ser detectada mediante el reactivo ninhidrina que origina un color violeta oscuro por la presencia de la glicina (Prats, 2008). También puede ser detectada con cloruro férrico para presenciar el ácido benzoico. Asimismo, cuando un estreptococo beta hemolítico que hidroliza el hipurato y son negativos para la bilis-esculina, pueden ser identificados como forma presuntiva para el *S. agalactiae* (Koneman *et al.*, 1998).

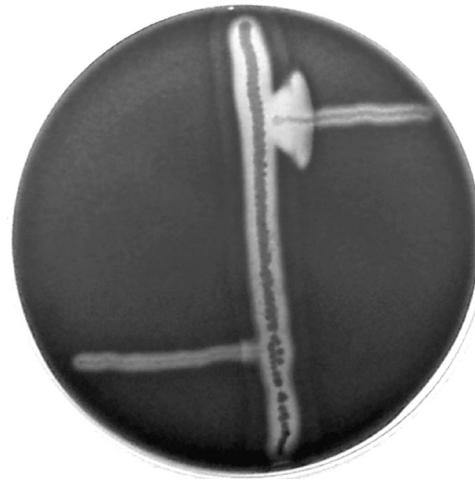


Figura 2. Factor CAMP positivo: identificación presuntiva de *S. agalactiae*, se observa la β - hemolisis completa, localizada en el punto más cercano de la estría, que convergen y se superponen los productos de los microorganismos (factor CAMP y β -lisina).

Los métodos de identificación mediante criterios genotípicos, se basan en el estudio del material genético del microorganismo, por medio de técnicas moleculares para el análisis de la secuencia de nucleótidos del DNA o RNA, la cual es específica para cada especie. La herramienta de PCR permite determinar la presencia de un gen o de una parte de él basándose en el DNA específico de un microorganismo, esta técnica también tiene una alta especificidad y suele ser muy sensible. Dentro de los métodos genotípicos, abarca una enorme cantidad de técnicas moleculares que con el paso de los años continuará creciendo y podrán ser integrados a los laboratorios de diagnóstico microbiológico (Forbes *et al.*, 2009).

Martínez y colaboradores utilizaron el método de PCR para la detección específica de *S. agalactiae* en la leche de vaca, con cebadores específicos y universales que derivan del gen 16S RNAr. El cebador sentido universal F1 y otros cebadores antisentido fueron combinados para la amplificación de DNA de las muestras de leche analizadas con ciertos parámetros de PCR. La combinación de los cebadores F1-IMOD fue lo que dio mejores resultados al obtener dichas amplificaciones que dieron el fragmento de tamaño aproximadamente a 220 pb. Asimismo, los otros cebadores antisentido fueron descartados porque amplifican para *Sreptococcus spp.*

Como se mencionó anteriormente, este microorganismo se encuentra como reservorio en el tracto

gastrointestinal, por lo cual suele estar también en el recto y en los genitales, porque se dispersa de manera secundaria a otros sitios; por ello se encuentra en la vagina de algunas mujeres (Fariña *et al.*, 2003). La colonización vaginal puede ser transitoria y depende de otras variables como la actividad sexual y el tipo de alimentación de la gestante. En los compañeros sexuales de mujeres colonizadas, también se ha aislado este microorganismo y el 50% son positivos para *S. agalactiae*. (Barillaro *et al.*, 2003).

Esta bacteria no causa trastorno alguno, pero si hay un desequilibrio en la flora bacteriana, puede causar una infección, siendo grave en el caso de mujeres embarazadas por el riesgo de poder entrar al líquido amniótico o contagiar al recién nacido al pasar por el canal de parto. Las mujeres gestantes se encuentran aproximadamente entre 15 y 40% colonizadas en vagina y recto. La frecuencia de colonización de los recién nacidos de madres colonizadas es entre 50 y 70% (Crespo Ortiz *et al.*, 2012).

Al portar la bacteria se genera una respuesta inmunitaria específica de serotipo y hay incrementos acumulativos de anticuerpos conforme a la edad. Debido a lo anterior, en las mujeres adultas hay menor riesgo de sufrir una infección. Las concentraciones de anticuerpos son más bajas en niñas y adolescentes, por lo que hay un mayor riesgo de infección por *S. agalactiae* (Koneman *et al.*, 2008). La colonización vaginal es inusual en la infancia, volviéndose más común en la adolescencia. Aproximadamente del 10 al 35% de las mujeres embarazadas están colonizadas por *S. agalactiae* en la vagina o en el recto. Hasta el 60% de las mujeres colonizadas portan el microorganismo en forma intermitente (MMRW, 2002).

Las mujeres embarazadas que portan el microorganismo también pueden dar origen a infección urinaria, corioaminionitis, endometritis postparto, infección de herida quirúrgica posterior a cesárea, endocarditis y fiebre (Barillaro *et al.*, 2003).

En la década de los años 70 surge como infección invasiva la colonización por *S. agalactiae* habiendo amplias variaciones geográficas, esto comenzó a ser un problema creciente en los países de desarrollo (Sarubbi *et al.*, 2000).

La incidencia de la colonización vagino-rectal por *S. agalactiae* en mujeres embarazadas, difiere según el área geográfica y está influida por la edad, por factores étnicos, sociales y socioeconómicos (Andreu *et al.*, 2003). Se han observado algunas diferencias raciales en cuanto al riesgo de coloni-

zación, por ejemplo se ha observado colonización vaginal masiva en mujeres afroamericanas estadounidenses y en mujeres con diabetes mellitus. Siendo la raza negra en la que se ha observado mayor incidencia (Rivas *et al.*, 2006).

Las estadísticas reportadas de colonización vaginal por el microorganismo, en los países desarrollados oscila entre 15 al 40%, mientras que en los países en desarrollo intermedio es de 4 al 20% (Barajas Viracacha y Báez, 2011). Por lo tanto, la colonización en mujeres embarazadas de los países en desarrollo intermedio es menor (Crespo Ortiz *et al.*, 2012).

Existe una variación en la tasa de colonización vaginal a nivel mundial. En Estados Unidos es entre 20 al 30%, en algunos países de Europa como Italia tiene el 21%, en España 11%, en Irlanda 26% (Torres Ocampo *et al.*, 2000) y Alemania entre 20 y 30% (Figueroa *et al.*, 2007). En algunos países asiáticos como Japón es del 22%. En países de Latinoamérica como en Chile tiene aproximadamente el 20% (Campodonico *et al.*, 2008). En Colombia existen reportes variables que van desde 0 hasta 25% (Duque *et al.*, 2010). En México, en 1981, se reportó la tasa de colonización vaginal de un 1.6% y otro reportado entre los años 1986 y 1987 por el Instituto Nacional de Perinatología de la Ciudad de México, fue de 10.3% (Torres Ocampo *et al.*, 2000). Luego de casi una década la colonización materna ocasionada por EGB entre los años 2000 al 2006, la variabilidad en las cifras registradas fue de 0.46 a 38.7%. En otros reportes del año 2001 se establecieron porcentajes diferentes de 14 y 20.4% (Figueroa *et al.*, 2007). Actualmente, México carece de estudios sobre la colonización vaginal por *S. agalactiae* en mujeres embarazadas, por falta de atención, ya que escasos investigadores han aportado información (Figueroa *et al.*, 2008).

El *S. agalactiae* es reconocido como el principal patógeno responsable de la infección neonatal. En el recién nacido, la enfermedad se presenta usualmente como sepsis, neumonía o meningitis, manifestándose como infección temprana y tardía. La infección temprana se presenta dentro de las 72 horas de vida, la forma de presentarse es con el síndrome de dificultad respiratoria. La infección tardía, se manifiesta después de las 72 horas hasta los 60 o más días, presentando septicemia con compromiso meníngeo o focal (Sarubbi *et al.*, 2000).

La vía de contagio fundamental del neonato es durante el parto, actuando como elementos favorecedores la rotura prematura de membranas y la co-

rioamnionitis (Barillaro *et al.*, 2003). De los recién nacidos por madres colonizadas el 1 a 2% de estos desarrollan infección (Crespo Ortiz *et al.*, 2012).

La neumonía neonatal es parte de una enfermedad sistemática generalizada como por ejemplo sepsis. La neumonía es un proceso inflamatorio agudo de uno o de ambos parénquimas pulmonares de origen infeccioso. Esta inflamación produce dificultad para respirar o a veces también provoca dolor. La neumonía puede ocurrir por aspiración de sustancias extrañas que entran a los pulmones (Ucrós Rodríguez y Mejía, 2009).

Existen cuatro vías de transmisión dependiendo del tiempo en que fue adquirida la neumonía del recién nacido (Rada Cuentas, 1997). Solo se mencionan las dos posibles causadas de infección por *S. agalactiae*, que tienen que ver con el parto:

Neumonía Perinatal. Es la forma de presentación más frecuente y es adquirida durante el parto. Los síntomas se manifiestan los primeros días de vida. La infección es producida por los microorganismos que colonizan el canal de parto materno (Rada Cuentas, 1997).

Neumonía postnatal. Es la adquirida después del nacimiento. Se manifiesta en el primer mes de vida y puede ser de adquisición o domiciliaria (Rada Cuentas, 1997).

La meningitis bacteriana se puede clasificar según el mecanismo de transmisión, en verticales y nosocomiales. La meningitis bacteriana es una enfermedad de gran importancia en la población pediátrica. Es una inflamación de las meninges, que son las membranas que cubren al cerebro y la médula espinal. Con mucha frecuencia la infección empieza en otras partes del cuerpo, como en los pulmones y el microorganismo causante es llevado por el torrente sanguíneo hacia las meninges (Maldonado y Jiménez, 1996).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que fallecen casi 5 000 000 de recién nacidos al año y que el 98% ocurre en países en desarrollo. Las principales causas de muerte neonatal son las infecciones, la asfixia y la prematurez. Se sabe que algunos gérmenes del tracto vaginal de la embarazada pueden afectar al producto de la concepción, produciendo desde afecciones insignificantes hasta infecciones graves con alta tasa de morbimortalidad y costos. El más importante es el estreptococo del grupo B (Zalazar, 2009).

S. agalactiae es la causa principal de morbilidad y mortalidad en recién nacidos (Lysakowska *et al.*, 2011). La incidencia por sepsis neonatal y la meningoencefalitis oscila entre 1 y 10 casos por cada 1 000 nacidos vivos y una mortalidad de 10 al 40% (Rodríguez Fernández *et al.*, 2008). También se reporta que la mortalidad por sepsis neonatal puede ser muy alta como 50% en recién nacidos que no son tratados, presentándose muertes neonatales del 13 al 15% (Ucrós Rodríguez y Mejía, 2009).

La incidencia de bacteriemias por EGB es de 0.5 por mil recién nacidos vivos (datos no publicados) en Buenos Aires, donde asistieron un total de 76 000 partos (Sarubbi *et al.*, 2000). En estados Unidos sin medidas de prevención la incidencia es aproximadamente de 3 casos por mil nacidos vivos (Ortiz *et al.*, 2004). Asimismo, la transmisión vertical al recién nacido se estima de 29 a 72% (Figueroa *et al.*, 2007).

Con respecto a las enfermedades neonatal tempranas, la incidencia está entre 1.3 y 5.4 por 1 000 nacidos vivos en Estados Unidos; en Alemania se calcula de 5.4 por 1 000 nacidos vivos; en Panamá es de 3.5 por 1 000 nacidos vivos y en México existe un informe de que varía de 3 a 15 por 1 000 nacidos vivos (Torres Ocampo *et al.*, 2000).

Con base en lo anterior, consideramos importante estudiar la presencia de *S. agalactiae* en mujeres embarazadas en Ciudad Juárez para de esta manera iniciar posteriores estudios epidemiológicos que permitan conocer la verdadera prevalencia de este microorganismo en nuestra población. Se conocen varios métodos que permiten establecer el diagnóstico clínico de la infección. En el presente trabajo detectaremos la presencia del microorganismo a partir de muestras clínicas y/o aislamientos en cultivo usando herramientas moleculares (ácidos nucleicos) mediante la amplificación de genes específicos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

METODOLOGÍA.

Se estudiaron mujeres con 35 a 37 semanas de gestación que acudieron a consulta a los hospitales en Ciudad Juárez. Previamente se solicitó autorización de las participantes, mediante el consentimiento informado.

Las muestras vaginales se obtuvieron por medio de hisopado de la secreción que se acumula en el saco vaginal posterior, empleando un espejo vaginal estéril. Se emplearon tubos eppendorf con 1 mL de solución salina al 0.8%, para luego ser con-

servadas a temperatura ambiente o mantenerlas en una estufa a 37 °C. dichos exudados, fueron proporcionados por la UMF No. 47 del IMSS, el IMSS Hospital general de zona No. 6 y del Hospital de la Mujer de Ciudad Juárez. Las muestras se enviaron inmediatamente (<12 h) al laboratorio de Genética Aplicada del Instituto de Ciencias Biomédicas de la UACJ; fueron transportadas en sus respectivos tubos manteniendo la temperatura indicada y separados con rotulo de identificación.

Extracción de ADN

Las muestras en tubos eppendorf con 1 mL de solución salina fueron resuspendidas y de ahí se tomó 100 µL para ser depositadas en otro tubo eppendorf de 1.5 mL, para luego centrifugar a 8 000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se removió. El material sedimentado se resuspendió en 800 µL de buffer lisis y se colocó en el vortex agitando vigorosamente, luego se incubó a 98 °C durante 30 s, se volvió a colocar en el vortex agitando vigorosamente durante 30 s y después se incubó a 4 °C durante 30 s, este procedimiento se realizó por triplicado. A la solución se le agregó 200 µL cloroformo y se mantuvo en el vortex de 1-2 min y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. Después se retiró la fase acuosa y se depositó en otro tubo eppendorf de 1.5 mL para agregar 50 µL de NaCl 5M. Luego se agregó 500 µL de isopropanol absoluto y se dejó reposar durante 10 min.

La muestra fue centrifugada nuevamente a 13 000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se retiró para resuspender con 500 µL de etanol al 70% y luego fue centrifugada a 14 000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se retiró nuevamente y se resuspendió en 50 µL de buffer TE. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de ADN se tomó 20 µL de la muestra y se colocó en un tubo eppendorf, luego se agregó 480 µL de buffer TE para obtener un volumen total de 500 µL. Se utilizó como blanco 500 µL de buffet TE y finalmente se leyó las absorbancias a 260 nm para cada muestra, obteniendo las cuantificaciones en ng/µL.

Método de ácidos nucleicos

Las extracciones de ADN de las muestras clínicas se sometieron a un PCR para amplificar una secuencia específica utilizando como referencia del origen de la muestra clínica al gen de la β-Globina y así deter-

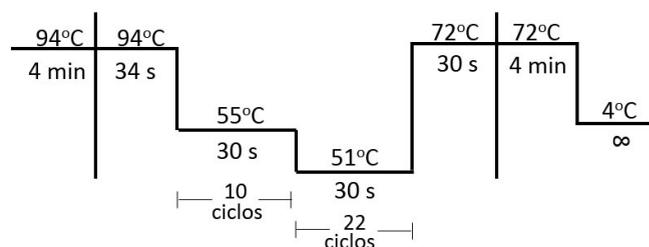
minar la calidad de las muestras en función a procedencia de humanos. Estas secuencias corresponden para GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' y PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3' que amplifican en una región de 260 pares de bases (pb). La mezcla de reacción para la PCR comprendió un volumen final de 25 µL con: 2 µL de muestra de ADN purificado, 12.5 µL de Green mater mix, 1.25 µL de cada uno de los indicadores y 8 µL de agua libre de nucleasas. La reacción se corrió en un termociclador con las siguientes condiciones: inició con una desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, sometidas a 32 ciclos de 68 min a 94°C, 60 s a 55°C, 60 s a 72°C, seguida por una extensión final de 4 min a 72°C.

Las muestras evaluadas para la amplificación de un gen de la β-Globina que resultaron positivas (con el ADN extraído anteriormente), se utilizaron para amplificar una región de 220 pares de bases (pb), empleando los cebadores F1 e IMOD reportados por Martínez y colaboradores 2000. La secuencia de estos corresponde para el F1 5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3' y el de IMOD 5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3'. El cebador F1 se preparó a 100 µM, al cual se le agregó 428 µL de H₂O inyectable. El cebador IMOD también se preparó a 100 µM, al cual se le agregó 367 µL de H₂O inyectable, ya que ambos se encontraban liofilizados.

Con los cebadores se realizaron alícuotas para tenerlos a una concentración final de 10 µM. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregó 10 µL del cebador (F1 e IMOD) y 90 µL de H₂O inyectable, para la concentración final.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con un volumen final de 25 µL que contiene: 2 µL de muestra de ADN purificado, 12.5 µL de Green mater mix, 1.25 µL de cada uno de los indicadores y 6.5 µL de agua libre de nucleasas.

Al tener una mezcla homogénea, se colocó en el termociclador, considerando las siguientes condiciones para la desnaturalización inicial, el alineamiento y una elongación final:



Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, el cual se preparó con 0.56 g de agarosa y se agregó 40 mL de buffer TAE 1X, para luego ser calentado durante 15 s. Al obtener una mezcla homogénea, se dejó enfriar y se agregó 3 µL de bromuro de etidio. La mezcla se solidificó en la cámara de electroforesis y se le agregó nuevamente el buffer TAE 1X hasta que cubriera completamente el gel de agarosa. Se tomó 2 µL del buffer mixto 6x y 1 µL del marcador de pares de bases, se mezclaron y se colocó en el primer pozo. Luego se tomó 5 µL del control positivo de la bacteria *S. agalactiae* y se colocó en el siguiente pozo. Asimismo, se tomó 5 µL de cada muestra y se colocaron en los siguientes pozos del gel formado. Las condiciones en las que se realizó la corriente de electroforesis son a 100 V por 30 min.

Finalmente los productos de la PCR o amplificones fueron observados en un transiluminador ultravioleta y a su vez en un fotodocumentador, los cuales corresponden a las bandas de un tamaño específico en pares de bases y así poder comparar con un marcador de peso molecular conocido y con el control positivo, determinando la especificidad de la reacción.

RESULTADOS.

Características del tamizaje para Streptococcus agalactiae

El tamizaje del *S. agalactiae* se realizó a 2 mujeres gestantes que asistieron al Hospital de la Mujer y a 28 mujeres que acudieron al UMF No. 47 del IMSS de Ciudad Juárez, de las cuales resultaron positivas por presentar la β hemolisis en agar sangre y la prueba de CAMP siendo característico para la bacteria. Los criterios de inclusión consistieron en tomar en cuenta solo a mujeres embarazadas, en los resultados no se involucró el historial clínico de las pacientes.

Determinación de la calidad de ADN extraído a partir de exudados vaginales con la β globina

Las 28 muestras provenían en frescos de los exudados vaginales en 1 mL de solución salina al 0.8%, de las cuales se extrajo el ADN mediante lisis celular y las concentraciones de ADN primero se emplearon para demostrar que las muestras son de origen humano y que hay presencia de ADN (Tabla 1), usando como marcador a una secuencia específica para la β globina (GH20 - PC04). Los productos de la amplificación para la β globina de algunas de las

muestras se obtuvieron a 260 pb aproximadamente en gel de agarosa al 1.5%, dichas muestras se observaron en un transiluminador y luego se tomaron las imágenes en un fotodocumentador (Figura 3).

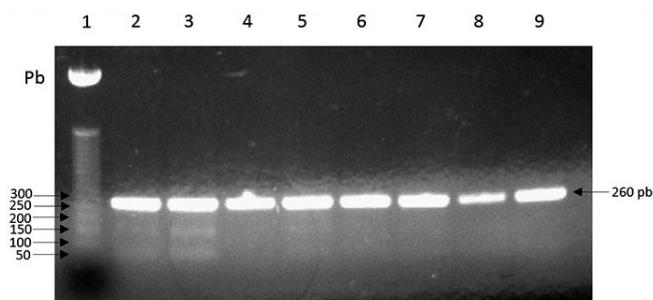


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% amplicones específicos de la β globina de las muestras analizadas. Carril 1: Patrón de PM 50pb, Carril 2 al 9: amplicados de β-globina a 260 pb.

Estandarización de la técnica de PCR para la detección de *S. agalactiae* a partir de exudados vaginales

Se extrajo el ADN de dos cepas aisladas positivas, mediante lisis celular y las concentraciones de ADN de *S. agalactiae* que se emplearon para la estandarización de la extracción se registraron en la tabla 2.

Muestra	Abs 260/280	Concentración de ADN (ng/µL)
29	1.80	16
30	1.82	12

Tabla 2. Concentración de ADN de *S. agalactiae* obtenido por extracción de lisis celular a partir de cepas aisladas positivas.

Las 30 muestras en total se sometieron a las temperaturas óptimas para el alineamiento que fueron 55°C y 51°C para la PCR con sus cebadores respectivos (F1-IMOD). En la figura 4 se muestran las amplificaciones que se obtuvieron a 220 pb aproximadamente en un gel de agarosa al 1.5 %, asimismo, en la figura 5 se muestran algunas de las muestras que no amplificaron la secuencia específica para el *S. agalactiae* en donde se utilizó una de las muestras positivas como control.

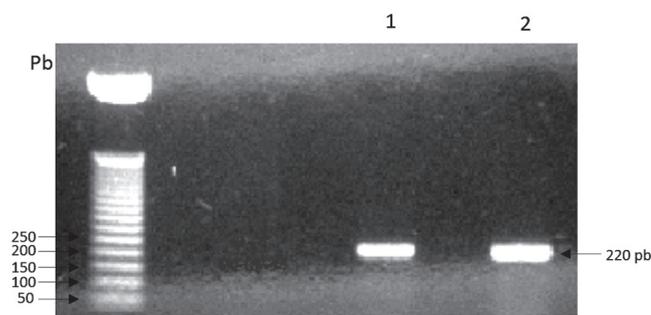


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de ampli-ficaciones de secuencias específicas del *S. agalactiae* de las cepas analizadas. Carril 1: Patrón de PM 50pb, Carril 2 a 3: amplificados de 220pb.

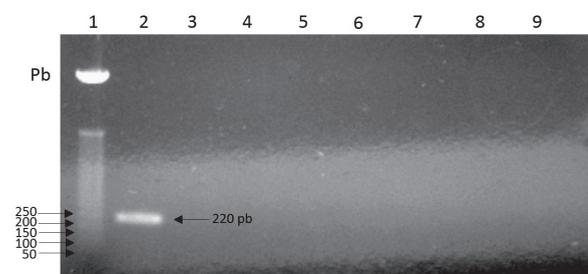


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% Carril 1: Patrón de PM 50pb, Carril 2: Control positivo, Carril 3 al 9: sin amplicones.

De las muestras analizadas mediante la técnica de PCR se obtiene una incidencia del 6.6 %.

CONCLUSIONES.

La colonización vaginal por *S. agalactiae* en la población estudiada es baja en relación con la de estudios realizados en nuestro país en años anteriores. Ante la carencia de las estrategias para prevenir infecciones neonatales por el *S. agalactiae* en los hospitales, se desconocen las tasas de mortalidad y morbilidad en cuanto al número de casos que se presentan cuando hay manifestaciones en los recién nacidos que se presentan como sepsis, neumonía o meningitis, debido a que la colonización vaginal se relaciona con esto.

Las técnicas de identificación que utilizan los hospitales son útiles para el diagnóstico de la bacteria, pero no en cuanto a las infecciones neonatales tempranas, así que se debería considerar una metodología más sensible y específica con un máximo valor predictivo positivo y un valor bajo de falsos negativos, como la metodología de amplificación de ácidos nucleicos. También, por esto es necesario

darle continuidad a este trabajo de investigación, ya que al conocer la prevalencia de la bacteria, se pueden evaluar las diferentes estrategias para su detección y en su caso un adecuado manejo.

Finalmente, cabe destacar la necesidad de la implementación a toda la población de mujeres embarazadas el tamizaje universal para colonización vagino-rectal de *S. agalactiae* y la profilaxis en aquellas mujeres gestantes colonizadas, para reducir el riesgo de contraer la infección en el neonato.

LITERATURA.

- Andreu, A.; Sanfeliu, I.; Viñas, L.; Barranco, M.; Bosch, J.; Dopico, E.; Guardia, C.; Juncosa, T.; Lite, J.; Matas, L; Sánchez, F. y Sierra, M. 2003. Declive de la incidencia de la sepsis perinatal por estreptococo del grupo B (Barcelona 1994-2001). Relación con las políticas profilácticas. *Enferm. Infecc. Microbiolo. Clin.* 21(4): 174-9.
- Ausina Ruiz, V. y Moreno Guillen, S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2005. 275 p.
- Barajas Viracacha, N. C. y Báez, M. 2011. Enfermedad neonatal temprana por *Streptococcus agalactiae* en una unidad de recién nacidos, factores de riesgo materno-fetales asociados a severidad y mortalidad. *Rev. Cienc. Salu.* 9(3): 251-258.
- Barillaro, S.; Monzo, C.; Negrin, G. y Brazeiro, D. 2003. Prevalencia del estreptococo Beta agalactiae en la población de embarazadas que consultan en la D.N.S.FFAA. *Salud Militar.* 25(1): 48-57.
- Cabero, L.; Saldívar, D.; Cabrillo, E. *Obstetricia y Medicina Materno - Fetal.* Editorial Médica Panamericana. España. 2007. 1213 p.
- Campodonico, L.; Doren, A.; Cruz, M. y Abarzua, F. 2008. Profilaxis de sepsis neonatal precoz por *Streptococcus agalactiae* (grupo B) basada en vacunas: revisión de la literatura. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 73(6): 411-418.
- Crespo Ortiz, M. P.; Henao Giraldo, E. A.; Espinita Chacón, L. M. y Herrera Jaramillo, M. H. 2012. Colonización por *Sreptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de los centros de atención de la ESE Norte en Cali. *Ciencia & Salud.* 1(2): 23-31
- Denamiel, G.; Puigdevall, T.; Chan, D. y Gentilini, E. 2013. Mastitis bovina: variaciones en la detección de β -hemolisis y factor CAMP para la

- identificación de *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Med. Vert.* 94(2): 24 – 27.
- Duque, C.M.; Gómez, B.; Olga; Gutiérrez, M.; Ruiz, E.; Leudo, A. G. y Montiel, S.S. 2010. Comparación de métodos para la recuperación y determinación de la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de Medellín. *Infect.* 14(2): 105-111.
- Espitia de la Hoz, F.J. 2008. Diagnóstico y Tratamiento de la corioamnionitis clínica. *Rev. Colomb. De Obs. Y Gine.* 58(3): 231-237.
- Fariña, N.; Balmaceda, M.A.; Sanabria, R.; Samudio, M.; Laspina, F.; Campuzano de Rolon, A.; Aparicio de Real, C.; Acosta, A. y Ortiz, G. 2003. Portación recto-vaginal de estreptococo beta hemolítico grupo B en embarazadas del Centro Materno Infantil y Hospital Santísima Trinidad. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2(1): 34-38.
- Figuroa, J.R.; Ortiz Ibarra, F.J.; Esteves Jaramillo, A. y Casanova Román, G. 2007. Colonización materna por *Sreptococcus* del grupo B en México: estimación de la prevalencia basada en la revisión bibliográfica. *Ginecol. Obstet. Mex.* 75(7): 399-403.
- Figuroa, J. R.; Ortiz Ibarra, F.J.; Pérez Antonio, B.; Navarro Godínez, S.; Casanova Román, G. y García Carrillo, L.E. 2008. Quimioprofilaxis para evitar la colonización materna por estreptococo grupo B. consecuencias de no adoptar la recomendación internacional. *Salud Pub. Mex.* 50(2): 155-160.
- Forbes, B.; Sahm, D. y Weissfel, A. *Diagnostico Microbiológico*. 12ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2009. 106 y 111 p.
- Glaser, P.; Rusniok, C.; Buchrieser, C.; Msadek, T.; Zouine, M.; Couve, E.; Laioui, L.; Poyart, C.; Trieu-Cout, P. y Kunst, F. 2002. Genome sequence of *Sreptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular microbiology.* 45(6): 1499-1513.
- Ingraham, J. e Ingraham, C. *Introducción a la Microbiología*. Volumen 2. Editorial Reverte. España. 1998. 526 p.
- Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V.; Janda, W.; Sommers, H. y Winn, W. *Diagnostico biológico: Texto y atlas color*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. 1998. 422 – 427 p.
- Koneman, E.; Allen; Janda; Koneman; Procop; Schreckenber; Woods. *Koneman Diagnostico microbiológico*. 6a edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2008. 650 p.
- Larcher, J. S.; Capellino, F.; De Giusto, R.; Travella, C.; Gomez, B. F.; Kreiker, G.; Prats, C. H.; Zarate, A.; Vilaro, M.; Hernández, D. y Ruiz, G. 2005. Colonización por estreptococo beta hemolítico del grupo b durante el embarazo y prevención de enfermedad neonatal. *Medicina. B. Aires.* 65(3): 201-206.
- López García. A.; Ruiz Tagle, A.; Rodríguez Pérez, R.; Mauleon Montero, A. y Rivera Tapia, J. A. 2012. Prevalencia de *Streptococcus agalactiae* en exudados vaginales de mujeres con displasia cervical. *Enf. Inf. Microbio.* 32 (2): 61-68.
- López Sastre, J.; Coto Cotallo, G. D.; Ramos Aparicio, A. y Fernández Colomer, B. Meningitis Neonatal. JDAMP (Junta Directiva de La asociación Española de Pediatría). Asociación Española de Pediatría. España. 2002. Fecha de consulta el 1 de marzo de 2014. Obtenido de http://www.laenfermeria.es/apuntes/otros/materno_infantil/neonatologia.pdf
- Lysakowska, M. E.; Kalinka, J.; Bigos, M.; Prosniewska, M. y Wasiela, M. 2011. Occurrence of virulence genes among *S. agalactiae* isolates from vagina and anus of pregnant women-a pilot study. *Archives of Peri. Med.* 17(4): 229-234.
- Maldonado y Jiménez. *Biología Molecular en medicina*. Editorial Limusa. México. 1996. 173 p.
- Martínez, G.; Harel, J. y Gottschalk, M. 2001. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. *J. Veterinary.* 65: 68-72.
- Mathur, N. B. *Neonatal Sepsis. ECAB Clinical UP-DATE: Pediatrics*. Editorial Elsevier. New Delhi. 2010. 1-4 p.
- MMRW. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. 2002. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 51(RR11): 1-22.
- Ortiz, T.; Humberto, J.; Calero, O.; Maruja; Aguirre, J.; Carlo, J.; Herrera, D.; Jorge; Cortez, J. y Guerra, A. 2004. Colonización vaginal y anorectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de los Hospitales Nacionales Cayetano Heredia y Arzobispo Loayza. *Rev. Med. Hered.* 15(3): 145-149.
- Parés, R. y Juárez, A. *Bioquímica de los Microorganismos*. Editorial Reverte. 1997. España. 178 p.
- Prats, G. *Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana. España. 2008. 62 p.

- Prescott, L.; Harley, J. y Klein, D. *Microbiología*. 5ª edición. Editorial McGraw-Hill. España. 2002. 571 p.
- Rada Cuentas, J. 1997. Neumonía Neonatal. *Rev. Soc. Bol. Ped.* 36(2): 79-81.
- Rivas, C.; Tallac, I. y Etchenique, A. 2006. Colonización vaginorrectal por *Streptococcus* del grupo B en mujeres embarazadas, entre las 35 a 37 semanas de gestación. *Rev. Med. Urug.* 22(3): 191-196.
- Rodríguez Cavallini, E.; Gamboa Coronado, M.; Hernández Chavarría, F. y García Hidalgo, J. *Bacteriología General: Principios y Prácticas de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 2005. 243 p.
- Rodríguez Fernández, O. M.; Sanchén Casas, A.; Cordero Rodríguez, M. y Deus Cabrera, J. 2008. Meningoencefalitis bacteriana por *Streptococcus agalactiae*. Reporte de un caso. *Rev. AMC.* 12(3). Accesado el 21 de marzo de 2008. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102502552008000300014&script=sci_arttext
- Romero Cabello, R. *Microbiología y Parasitología Humana*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. 707 - 708 p.
- Ryan, K. J. y Ray, G. C. *Microbiología médica*. 4ª Edición. Ediciones Mc Graw Hill. México. 2005. 212-313 p
- Sarubbi, M. A.; Dinerstein, N.A.; Paganini, H.; Botto, L. y Larguía, M.A. 2000. Bacteriemias Neonatales por estreptococo β hemolítico del grupo B: Trece años de experiencia. *Rev. Hosp. Mat.* 19(2): 52-59.
- Torres Ocampo, M.; Pérez Sánchez, J.H.; Nazar Beutelspacher, A.; Castro Ramírez, A. E. y Cordero Ocampo, B. 2000. *Salud Pub. Mex.* 42(5): 413-421.
- Ucrós Rodríguez, S. y Mejía Gaviria, N. *Guías de pediatría basadas en la evidencia*. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Colombia. 2009. 91-97 p.
- Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. y Woods, G. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6ª edición. Editorial Lippincott Williams&Wilkins. 2006. USA. 683 - 684 p.
- Zalazar, J. A. 2009. *Prevalencia de Streptococcus agalactiae en mujeres embarazadas*. (Tesis doctoral inédita). Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Efectibilidad y factibilidad de los métodos de análisis de la composición de la dieta de venados

*Olivas Sánchez, Martha¹
Vital García, Cuauhcihuatl^{1,2}
Flores Márgez, Juan¹*

RESUMEN

El presente análisis documental está enfocado en examinar los diferentes métodos que existen para determinar la composición de la dieta de venados, mismos que se utilizan para determinar la dieta en rumiantes. Se consideraron artículos acerca de diferentes especies de venados en varias regiones del mundo. El objetivo fue comparar la efectividad y factibilidad de los métodos. Entre los aspectos a considerar fueron el tipo de muestras y el alcance de cada método para conocer la composición de la dieta hasta taxones menores como género y especie o por tipo de forraje (pastos, herbáceas o arbustos). Estos estudios comprenden regiones de Europa, África, Australia, Norte y Sudamérica. Encontramos que existen cinco metodologías: 1) microhistología, 2) espectroscopia de rayos infrarrojos, 3) análisis de la fistulación de rumen o esófago, 4) uso de alcanos lineales en cutículas de plantas (ceras), 5) observación en campo. Entre los más utilizados están el análisis microhistológico de heces y el análisis de rumen, considerado este último por algunos autores como el más preciso; sin embargo, no ofrece la ventaja del fácil acceso de las muestras como el microanálisis, así como prácticamente ilimitada cantidad de muestras y el requerimiento de equipo no especializado.

Palabras clave: heces de venado, microanálisis, n-alcanos, infrarrojo, rumen, fistulación esofágica.

1 Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Departamento de Ciencias Químico Biológicas.

2 Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ave. Plutarco Elías Calles, Ciudad Juárez, Chihuahua. C.P. 32310, México.

* Autor correspondiente: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Ave. Plutarco Elías Calles, Ciudad Juárez, Chihuahua. C.P. 32310, México. Tel. (656) 313 7523; (656) 688 1886. Correo Electrónico: polivas@uacj.mx.

INTRODUCCIÓN

La valoración del impacto del venado sobre los ecosistemas ha dado lugar a numerosos trabajos sobre sus hábitos alimenticios y la composición de su dieta (Garín, *et al.* 2001). Estudios sobre algunas especies han demostrado efectos benéficos en la dispersión de semillas y el aporte a la regeneración del hábitat, así como efectos contraproducentes a largo plazo, sobre todo en especies introducidas, como la disminución de la biodiversidad vegetal y en consecuencia la invasión de malezas (Wichatitsky & Roques-Rogery, 2005). Asimismo, el estudio de la composición de la dieta del venado en diferentes regiones del mundo, se reconoce como un factor importante en el manejo de sus poblaciones (Otis, 1997). Por otro lado, se conocen diferentes dietas dependiendo del hábitat en que se encuentra, ya que es un componente de la fauna silvestre adaptable a una gran variedad de ecosistemas (Feldhamer & McShea, 2012).

El conocimiento de la composición de la dieta de animales silvestres y en particular del venado, se utiliza para inferir aspectos claves en el sostenimiento del animal y su relación con el hábitat.

En general en el mundo, se han realizado diversos estudios sobre la composición de la dieta de venados que habitan una amplia diversidad de ecosistemas.

En todas las metodologías empleadas para conocer la composición de la dieta de rumiantes es necesario contar con la muestra a analizar. Existen diferentes métodos para obtener dichas muestras, entre las más comunes están la fistulación esofágica y muestras de heces. Una vez obtenida la muestra, se pueden emplear diversos métodos para conocer la composición de la dieta, los más comunes son: a) Técnicas de fistulación del contenido del rumen o esófago, b) análisis microhistológico, c) determinación de alcanos lineales también conocidos como ceras, d) espectroscopia infrarroja y e) análisis del contenido estomacal.

En este estudio se revisaron 60 artículos científicos, provenientes de 58 revistas científicas. Además, 6 tesis, 8 libros y 1 reporte de investigación publicados entre los años 1980 y 2012. Con la finalidad de comparar la efectividad, la factibilidad y alcances de los métodos empleados en la determinación de la composición de la dieta en venados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación a las cinco metodologías más utilizadas para conocer la composición de la dieta de venados.

En la tabla 1 se aprecia que el más empleado es el microanálisis, en más del 60% de los trabajos. Algunos trabajos se combinan con la observación directa de los animales en campo, lo cual es una práctica muy efectiva para determinar hábitos alimenticios, cuando se trata de observación de la vida silvestre.

Observación en campo

La determinación de la selección de la dieta en herbívoros a través de la observación en campo es un método que se ha empleado desde los años 20. Varía desde el seguimiento del animal y la observación de sus hábitos alimenticios, hasta el conteo de mordidas en las plantas ramoneadas. Entre los primeros estudios sobre venado, Dixton (1934) reportó los hábitos alimenticios del venado, siguiendo y recorriendo al animal mientras pastoreaba, en un área de California y midiendo el tiempo de pastoreo de cada planta. Reppert (1960) en su trabajo sobre preferencias de forraje y hábitos de pastoreo en el ganado vacuno en Colorado, hace mención de algunos autores empleando actividades de observación, como: Corv, 1927, Culley, 1937; Hopkins, 1951; Greelen y Thomas, 1957; Halls, 1954; Doran, 1943; Hubard, 1952. Por otro lado, Sanders y colaboradores (1980), compararon el método de observación de conteo de mordidas en campo contra el microanálisis de heces, para ganado vacuno en pastoreo, concluyendo que los análisis fecales reportan resultados muy similares al conteo de las mordidas, pudiéndose emplear en condiciones desfavorables de clima y con un trabajo mínimo de campo. Entre las desventajas del método observación en campo, se mencionan el consumo de tiempo y el entrenamiento para distinguir las mordidas en las plantas (Holechek, 1982c).

Reppert, J.N. 1960. Forage preference and grazing habits of cattle at the Eastern Colorado Range Station. *J. Range Manage.* 13:58-62.

Dixton (1934) (Bjugstad *et al.* 1970, (Reppert 1960). Free *et al.* (1971), Regelin *et al.* (1974), (Krueger *et al.* 1974), Free *et al.* 1971, Sanders *et al.* 1980). However, Sanders *et al.* (1980) reported that direct observation was not practical for use on large, Tixier H. DP.

Sanders, K.D., B.E. Dahl, and G. Scott. 1980. Bite-count vs. fecal analysis for range animal diets. *J. Range Manage.* 32: 146-149.

Scotcher, J.S.B. 1979. A review of faecal analysis techniques for Scotcher, J.S.B. 1979. A review of

faecal analysis techniques for determining the diet of wild grazing herbivores. *Proc. Grassld. Sot. Afr.* 14: I3 I-136.

Microhistología

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para determinar la composición de la dieta de herbívoros (Karmiris *et al.* 2011), puede realizarse en muestras fecales, estomacales o extrusas esofágicas (Alipayo, *et al.* 1992).

Se basa en la comparación bajo el microscopio de patrones epidérmicos identificables de plantas como tricomas y otras características fisiológicas con fragmentos epidérmicos vegetales en las muestras (Holechek 1982a). En las primeras etapas de su desarrollo, Sparks y Malecheck (1968) asumieron que existía una relación de la densidad relativa y el porcentaje de materia seca de los fragmentos identificables, trabajaron con 11 diferentes mezclas, usando el método de Fracker y Brischle (1944) y determinaron que existía una relación de frecuencia-densidad entre la aparición de los fragmentos vegetales en heces. Posteriormente, Johnson (1982) elaboró la conversión matemática de frecuencia a densidades. Existen otros autores en las primeras etapas que emplearon la microhistología en la determinación de la composición de la dieta en herbívoros como Williams (1969) y Ward (1970). La precisión de la técnica fue evaluada por otros investigadores como Hansen *et al.* (1973) y Dearden *et al.* (1975), Havstad y Donart (1979), así como Holechek y su equipo en los años 80 (Holechek *et al.*, 1982a; Holechek *et al.* 1982b; Holechek *et al.*, 1982c; Holechek, *et al.* 1984), en el que se reporta que se requieren mínimo 15 muestras de diferentes grupos fecales para un área y la lectura de 100 campos, el cual reporta en sus resultados que es importante un buen entrenamiento en la distinción de tejidos epidérmicos y lo identifica como un método confiable en el uso de muestras fecales.

Se han efectuado estudios comparando la efectividad de los estudios del análisis de rumen y del contenido de fistulación esofágica con el microanálisis. Los resultados han llevado a algunos autores a considerar el análisis de contenido fecal como un método rentable y no invasivo (Todd & Hasen, 1973). Sin embargo, algunos lo consideran como un método inexacto (Gill *et al.*, 1983, Barker, 1986). Otros autores han desarrollado la aplicación de este método con algunos tejidos no epidérmicos (Sepúl-

veda-Palma *et al.*, 2004) y también se han generado diversos procedimientos para el tratamiento de las heces (Castellaro *et al.*, 2007). Todos responden a la necesidad de mejorar el reconocimiento de los fragmentos en la muestra, sin perder exactitud en la cuantificación. Una de las desventajas de este método es que en ocasiones se subestiman plantas que carecen de fragmentos identificables en las heces (Leslie, 1983; Holechek & Valdez, 1985) y por eso algunos autores proponen utilizar criterios de cuantificación o factores de corrección (Johnson & Wofford, 1983; David, *et al.*, 1983; Barker, 1986, Catán, *et al.*, 2007). Sin embargo, las principales ventajas del microanálisis son la posibilidad de estudiar la dieta de animales silvestres sin interferir en sus comportamientos, la posibilidad de obtener gran cantidad de muestras permite estudiar la dieta de una especie animal de una forma no invasiva y no requiere de equipos de laboratorio muy especializados (Garin, *et al.* 2001). Maizeter *et al.* (1986) mencionan que posibilita el análisis de importantes especies vegetales comparando diferentes tiempos y áreas. Además, permite llegar a determinar la densidad de géneros y especies de plantas contenidas en la dieta, así como por grupo de plantas como arbustos, pastos o herbáceas.

Fistulación esofágica o del rumen

Este método fue desarrollado por Chamrad y Box (1964). Consiste en el análisis del material obtenido de la fistulación del rumen o del esófago, ambas fistulas han sido usadas ampliamente (Theurer *et al.*, 1976) con observación macroscópica de los fragmentos de plantas que aparecen después de un procesamiento de lavado y tamizado, los fragmentos se identifican al menor taxón posible usando una colección de referencia (Storms, *et al.*, 2008). Sin embargo, este método requiere el sacrificio de animales o la permanencia de animales en cautiverio, por lo que en ocasiones resulta inconveniente (Uvalle-Sauceda, 2001).

Varios estudios han demostrado que la estimación de la composición botánica por la fistulación esofágica es baja en precisión (Holechek J. L. VM, Pieper R. D. 1982c). De acuerdo con Van Dyne y Heady (1965), se requieren 24 o más animales para adecuar la estimación de especies con una precisión de un 90% de confianza y para clasificar en tipo de forraje (pastos, hierbas o arbustos), hasta 9 animales. Otros autores como Galt *et al.* (1969), encontraron

que se requieren hasta 30 animales para adecuar en un 99% de confiabilidad en especies en un área de pastoreo del desierto de Arizona.

Anthony y Smith (1974) compararon la eficiencia de la técnica de microhistología en heces y la técnica de análisis de rumen, analizando las dietas de Venado bura (*Odocoileus hemionus*) y Venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), colectaron simultáneamente muestras de rumen y de heces, al suroeste de Arizona, Estados Unidos, concluyendo que la técnica de microhistología resulta muy similar en confiabilidad al análisis volumétrico del rumen.

Análisis del contenido estomacal

Un procedimiento usado en la determinación de la composición de la dieta incluye también el análisis del contenido del tracto digestivo, que por lo general es el estómago y en ocasiones del intestino, la desventaja es que involucra el sacrificio de animales y la destrucción de una porción del forraje por digestión del alimento consumido (Holechek y Pieper, 1982c). Esta práctica ha sido utilizada desde los años 40 (Norris, 1943; Hill 1946; Martin, 1949) y ha sido empleada en diferentes estudios de composición de la dieta en herbívoros (Courtright, 1959; Brown, 1961; Chippendale, 1962; Talbot y Talbot, 1962; Chamrad y Box 1964; Bergerud y Russell, 1964; Anderson *et al.*, 1965; Korschgen, 1966; Scatter, 1966; Chamrad y Box, 1968; McInnis, 1977; Smith y Shandruk, 1979; Vavra y Holechek, 1980). La ventaja es que provee información sobre las especies de plantas que han sido consumidas y las proporciones relativas. De acuerdo con Medin (1970), este método permite hacer tabulaciones de la clase de alimento, frecuencias, volumen y peso del forraje y lo cataloga como un método preciso. Sin embargo, requiere el sacrificio de animales, que resulta inconveniente si se trata de estudiar vida silvestre en especies de población reducida (Holechek J. L. VM, Pieper R. D, 1982c).

Uso de n- alcanos cuticulares (Ceras)

Este método consiste en determinar la composición botánica de la dieta de herbívoros usando ceras (alcanos) de la cutícula de las plantas provenientes del material fecal (Carnahan, 2011). La historia del uso de los componentes cerosos de las plantas para determinar la nutrición de herbívoros fue determinada ampliamente por Dove y Mayes (1991). En los estudios de taxonomía de plantas, se han reconocido las diferentes características en los patrones

de concentración de los n-alcanos, estos son largas cadenas de hidrocarburos saturados (Kolattukudy, 1976; Tulloch, 1976; Bugalho, *et al.*, 2005), por eso es posible usarlos en la determinación químico-taxonomía a través de análisis químicos calibrados (Dove & Mayes, 1996). Generalmente se emplea para estos análisis la cromatografía de gases con el método de Mayes *et al.* (1986) modificado por Salt *et al.* (1994), haciendo calibraciones y comparaciones de la composición de n-carbonos en plantas, con el contenido en el material fecal (Martins, *et al.* 2002, Bugalho, *et al.* 2005). Este método se ha utilizado con más frecuencia en la determinación de la composición de la dieta de herbívoros domésticos, más que para animales silvestres, debido a que la variedad de la dieta de la fauna silvestre, hace más compleja la comparación con los patrones de n- alcanos de plantas (Ali, *et al.* 2005). Su alcance puede llegar a determinar taxones como géneros y especies o grupos de plantas en la dieta (pastos, arbustos o hierbas), en estudios en venados algunos trabajos se han combinado con la observación directa en campo (Bugalho, *et al.*, 2001).

Espectroscopia infrarroja (NIRS)

Esta técnica se emplea para obtener información sobre el contenido de la dieta usando isotopos radiactivos, C¹³ y N¹⁵, el primero refleja la clase de plantas en la dieta y el N¹⁵ indica la calidad de los diferentes tipos de forraje (Stewart, *et al.* 2003; Showers, *et al.* 2006; Li *et al.* 2007). Trabajos como el de Landau, *et al.* (2006), que consiste en una revisión de literatura desde 1980 hasta el 2004, sobre este método, expone las ventajas y desventajas para detectar tanto la calidad como la composición de la dieta en rumiantes pequeños, concluyendo que resulta muy efectivo para medir la calidad del forraje usando excretas o contenidos esofágicos. Asimismo, se pueden evaluar parámetros como la concentración de materia seca, proteína cruda y concentración de compuestos fenólicos, entre otros, además ha sido utilizado para conocer el porcentaje de tipos de forrajes (pastos, hierbas, arbustos). Shower *et al.* (2006) probó por primera vez esta técnica en la predicción de la calidad de la dieta en Venado cola blanca, empleando dietas preparadas, con lo cual adecuó las calibraciones para esta especie de NIRS.

La ventaja de este método es que se pueden usar muestras como excretas o de otro tipo no invasivas, por ejemplo Druckerab, *et al.* (2009) trabajaron con pelo de Caribú y Alce mostrando que el uso

de isotopos tiene un gran potencial para determinar la dieta y el hábitat de selección en rumiantes. Por otro lado, Li *et al.* (2007) emplearon la espectroscopia de rayos infrarrojos (NIRS) como un método no invasivo para la detección de la calidad de la dieta en heces de ovejas (*Ovis aries*), con buenos resultados para monitorear el manejo de animales en pastoreo. Steward *et al.* (2003) evaluaron el nicho alimentario del Venado bura, Alce americano y ganado bovino usando esta misma técnica, encontrando que hay diferencias en el régimen de humedad y tipos de forraje preferidos. Finalmente, podemos concluir que la espectroscopia infrarroja es uno de los métodos de laboratorio más versátiles y calibrados y que su uso en la determinación de análisis nutricionales para herbívoros está ganando reconocimiento, ha sido utilizado con éxito para animales domésticos y está en desarrollo para el análisis de nutrición de fauna silvestre. Para algunos autores (Coates, 1999; Landau, *et al.* 2006) ha resultado una técnica más precisa que el análisis microhistológico en la predicción de la composición de porcentajes, para especies pequeñas de rumiantes. Sin embargo se requiere de calibraciones delicadas y muy elaboradas, tanto para determinar el tipo de planta y para cada especie de rumiante

CONCLUSIONES

El estudio en aspectos relacionados a la dieta de los venados en el mundo se ha desarrollado desde hace varias décadas, no es sino hasta los años 80 cuando se incrementa el interés en evaluar la composición y la calidad de la misma.

En cuanto a los métodos de análisis de la composición de la dieta, podemos concluir que entre los más utilizados están el microanálisis de heces y el análisis del contenido del rumen. Los resultados llevan a considerar, por algunos autores (Mussa, *et al.*, 2003) al método de microhistología como uno de los más rentables, ya que permite obtener fácilmente una gran cantidad de muestra en diferentes puntos y la posibilidad de estudiar la dieta de la fauna silvestre sin interferir en su comportamiento y hábitat. Una desventaja que presenta es que hay tejidos que escapan a su detección.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al doctor E. Alvarez Padilla y al Dr. A. Martínez Martínez, por sus comentarios en la elaboración del presente, al doctor P. Lavín Murcio, a la doctora M. Quiñónez Martínez, al doctor A. de

la Mora Covarrubias, a la M. en C. I. D. Enríquez Anchondo, a la M. en C. Nayeli Vera y al M. en C. Mario Prieto por sus comentarios en las primeras etapas de este manuscrito. A la Ing. V. Flores Olvera, responsable de la Biblioteca del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez y a la Biblioteca de *The University of Texas at El Paso (UTEP)* por el apoyo en el acceso de la información y en la adquisición de artículos científicos.

LITERATURA CITADA

- Alcalá, G. C. H. Response of Desert Mule Deer to Habitat Alterations in the Lower Sonora Desert. In *Dissertation Submitted to the Faculty of the School of Natural Resources. Degree of Doctor of Philosophy with Major in Wildlife Conservation and Management*. The University of Arizona. 2005.
- Ali H. A., Mayes R. W, Hector B. L., Verma A. K, Ørskov E. R. The possible use of n-alkanes, long-chain fatty alcohols and long-chain fatty acids as markers in studies of the botanical composition of the diet of free-ranging herbivores, *Journal of Agricultural Science* 2005; 143: 85-95.
- Alipayo D., Valdez R., Holecek J.L., Cárdenas M. Evaluation of microhistological analysis for determining ruminant diet botanical composition, *Journal of Range Management* 1992; 45: 148-52.
- Arceo G., Mandujano S., Gallina S., Perez-Jimenez L. A. Diet diversity of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in a tropical dry forest in Mexico, *Mammalia* 2005; 69(2): 159-68.
- Barker, R. D. An investigation into the accuracy of herbivore diet analysis. *Australian Wildlife Research* 1986; 13: 559-568.
- BECK, J. L., Peek J. M., Diet Composition, Forage Selection, and Potential for Forage Competition Among Elk, Deer, and Livestock on Aspen-Sagebrush Summer Range, *Rangeland Ecology & Management*, 2005; 58 (2): 135-47.
- Bugalho M., Milne J., Mayes R., Rego F. Plant-wax alkanes as seasonal markers of red deer dietary components, *Canadian Journal Of Zoology [serial online]* 2005; 83 (3): 465-73.
- Bugalho M. N, Milne J. A. The Composition of the Diet of Red Deer (*Cervus elaphus*) in a Mediterranean Environment: a Case of Summer Nutritional Constraint?, *Forest Ecology and Management* 2003; 181: 23-29.
- Bugalho M. N., Milne J. A., Racey P. A. The fora-

- ging ecology of red deer (*Cervus elaphus*) in a Mediterranean environment: is a larger body size advantageous?, *Journal of Zoology, Lond.* 2001; 255: 285-289.
- Campbell E.G., Johnson R.L. Food habits of mountain goats, mule deer, and cattle on Chopaka Mountain, Washington, 1977-1980', *Journal of Range Management* 1983; 36 (4): 488-491.
- Carnahan, A. M. Determining the Diets of Moose (*Alces alces*) in Alaska Using Plant Wax Components. ', 2011 (University of Alaska Anchorage).
- Castellaro G.G., Squella F. N., Ullrich T. R. , León F. C., Raggi A. S. Algunas técnicas microhistológicas utilizadas en la determinación de la composición botánica de dietas de herbívoros. *Agricultura técnica (Chile)* 2007; 67 (1): 86-93.
- Catán A., Degano C. A., Werenitzky D. Evaluación de criterios de lectura microhistológica para la cuantificación de *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.), Pl Lorentz en mezclas manuales. ', *Técnica Pecuaria en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias* 2007; 45 (1): 77-83.
- Chamrad A.D., Box T. W. A point-frame for sampling rumen contents, *Journal of Wildlife Management* 1964; 28: 473-77.
- Clemente F., Riquelme E., Mendoza G.D. , Bárcena G., González S., Ricalde R.), 'Digestibility of forage diets of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus* Hays) using different ruminal fluid inocula, *Journal of Applied Animal Research* 2005; 27: 71-76.
- Coates, D.B. Faecal spectroscopy (NIRS) for nutritional profiling of grazing cattle, in D. Eldridge, Freudenberg, D. (ed.), *People and Rangelands: Building the Future. Proc. 6th Intl. Rangeland Congress, Townsville* (1; Queensland Australia: International Rangeland Congress Aitkenvale), 1999; 466-68.
- Darr, R. L. Effects of Habitat Enrichment on White-Tailed Deer Selective Foraging and Productivity in a Semi-Arid Landscape: an Ecological Approach Using Stable Isotopes, 2009 (Texas A&M University-Kingsville).
- De Garine-Wichatitsky, M., P. Duncan, A. Labbé, B. Suprin, P. Chardonnet y D. Maillard, A review of the diet of rusa deer *Cervus timorensis* russa in New Caledonia: Are the endemic plants defenceless against this introduced, eruptive ruminant?, *Pacific Conservation Biology* 2003; 9: 136-14.
- Dove H., Mayes R. M. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review, *Aust. J. Agric. Res.* 1991; 42: 913-52.
- Dove H., Mayes R. W, Plant wax components: A new approach to estimating intake and diet composition in herbivores, *Journal of Nutrition* 1996; 126: 13-26.
- Druckerab D. G., Hobsona K. A, Ouelletc J. P., Courtoisd R. (), 'Influence of forage preferences and habitat use on 13C and 15N abundance in wild caribou (*Rangifer tarandus caribou*) and moose (*Alces alces*) from Canada', *Isotopes in Environmental and Health Studies* 2010; 46 (1): 107-21.
- Feldhamer, G.A. y W. J. McShea, *Deer: The Animal Answer Guide* (Baltimore: Johns Hopkins University) 2012; 163.
- Frisina M. R., Wambolt C. L., Fraas W. W., Guenther G.), 'Mule deer and elk winter diet as an indicator of habitat competition', in Rosemary L.; Monaco Stanley G.; Pendleton, Thomas A.; and Jason Vernon (eds.), *Proceedings-Shrublands under fire: disturbance and recovery in a changing world; 2006*; (Cedar, UT. Proc. RMRS-P-52. Fort Collins, CO:US: Department of Agriculture, Forest service, Rocky Mountain Research Station), 2008; 123-26.
- Fulbright T., Ortega S. A. (2007), *Ecología y Manejo del Venado Cola Blanca*, ed. Texas A&M University.
- Gallina, S. White-tailed deer and cattle diets at La Michilia Durango, Mexico, *Range Management* 1993; 46: 487-92.
- Garin I., Aldezabal A., García-González R., Aihartza J. R. (), 'Composición y calidad de la dieta del ciervo (*Cervus elaphus* L.) en el norte de la península ibérica', *Animal Biodiversity and Conservation* 2001; 24 (1).
- Geist, V. (), *Deer of the World: Their Evolution, Behaviour and Ecology* 1998 (Mechanicsburg, PA: Stackpole Books.).
- Hanley, T. A. A Nutritional View of Understanding and Complexity in the Problem of Diet Selection by Deer (Cervidae), *Oikos* 1997; 79 (2): 209-18.
- Holechek, J. L. Evaluation of Microhistological Analyses for Determining Ruminant Diet Botanical Composition, *Journal Range Management* 1982. (a); 36: 305-11.
- Holechek J. L., Gross B., Dabo S. M., Stephenson

- T. Sample preparation techniques for microhistological analysis. *Journal of Wildlife Management* 1982 b; 46: 502-05.
- Holechek J. L., Vavra M., Pieper R. D. Botanical composition determination of range herbivore diet: a review', *Journal of Range Management* 1982 c; 35: 309-15.
- Holechek J. L., Valdez R. Magnification and shrub stemmy material influences on fecal analysis accuracy, *Journal of Range Management*, 1985 d; 38: 350-52.
- Homolka M., Heroldová M., Bartoš L. White-tailed deer winter feeding strategy in area shared with other deer species, *Folia Zool* 2008; 57 (3): 283-93
- Hosten P.E., Whitridge H., Broyles M. Diet Overlap and Social Interactions among Cattle, Horses, Deer and Elk in the Cascade-Siskiyou National Monument, southwest Oregon. U.S., (Department of the Interior, Bureau of Land Management, Medford District. <http://soda.sou.edu/bioregion.html>), (2007), 36.
- Johnson M.K., Wofford H. Digestion and fragmentation: influence on herbivore diet analysis, *Journal of Wildlife Management* 1983; 47: 877-79.
- Kasworm W. F., Irby L. R., Ihsle-Pac H. B. Diets of ungulates using winter ranges in northcentral Montana', *Journal of Range Management* 1984; 37 (1): 67-71.
- Kolattukudy, P.E. Introduction to natural waxes in Amsterdam Elsevier (ed.), *Chemistry and biochemistry of natural waxes* 1976; 1-5.
- Landau, S., Glasser T., Dvash L. Monitoring nutrition in small ruminants with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: A review, *Small Ruminant Research* 2006; 61: 1-11.
- Leslie D. M. Jr., Vavra M. , Starkey E. E., Slater R. C. Correcting for differential digestibility in microhistological analyses involving common coastal forages of the Pacific Northwest', *Journal of Range Management* 1983; 36: 730-32.
- Li H., Tolleson D., Stuth J. , Baic K., Mo F., Kronberg S. Faecal near infrared reflectance spectroscopy to predict diet quality for sheep, *Small Ruminant Research* 2007; 68: 263-68.
- Lucich G. C., Hansen R.M. Autumn Mule Deer Foods on Heavily Grazed Cattle Ranges in Northwestern Colorado, *Journal of Range Management*, 1981; 34: 72-73.
- Martins H., Elston D. A., Mayes R. W., Milne J. A. Assessment of the use of n-alkanes as markers to describe the complex diets of herbivores, *Journal of Agricultural Science* 2002; 138: 425-34.
- Mayes R. W., Dove H. Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores, *Nutrition Research Reviews* 2000; 13: 107-38.
- Mayes R.W., Lamb C. S., Colgrove P. M. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake, *J. Agric. Sci.* 1986; 107: 161-70.
- Mussa P.P., Aceto P., Abba C. , Sterpone L., Meineri G. ('Preliminary study on the feeding habits of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the western Alps, *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr* 87; 105-08.
- Ockenfels R. A., Lewis C. H. Coues White-tailed Deer Dietary Overlap with Cattle in Southern Arizona, *Elk-Deer Workshop. Arizona Game and Fish Department, Research Branch* (Arizona), 1997; 89-95.
- Otis, D. Analysis of habitat studies with multiple patches within cover types, *Journal of Wild Management* 1997; 61: 1016-22.
- Plumptre, A. J. The chemical composition of montane plants and its influence on the diet of the large mammalian herbivores in the Pare National des Volcans, Rwanda, *Journal of Zoology* 1995; 235 (2): 323-37.
- Quintanilla- González, J. B. Determinación Botánica de la Dieta del Venado Cola Blanca, (Universidad de Nuevo León). 1989.
- Sandoval L., Holechek J., Biggs J., Valdez R., VanLeeuwen D. Elk and Mule Deer Diets in North-Central New Mexico, *Rangeland Ecology & Management* 2005; 58 (4): 366-72.
- Sepúlveda-Palma L., Pelliza A., Manacorda M. La importancia de los tejidos no epidérmicos en el microanálisis de la dieta de herbívoros, *Ecologica Austral* 2004; 14: 31-38.
- Showers S.E., Tolleson D. R., Stuth J. W., Kroll J. C., Koerth B. H. Predicting Diet Quality of White-Tailed Deer via NIRS Fecal Profiling, *Rangeland Ecology & Management* 2006; 59 (3): 300-07.
- Sparks D. R., Malecheck J.C. Estimating percentage dry weights in diets using microscopic techniques, *Journal of Range Management* 1968; 21 (4): 264-65.
- Stewart K. M., Bowyer R.T., Kie J. G., Dick B. L.,

- Bend-David M. Niche partitioning among mule deer elk and Cattle do stable isotopos reflect diet, *Eciscience* 2003; 10 (3): 297-302.
- Storms D., Aubry P., Hamann J.L., Said S., Fritz H., Saint-Andrieux C., Klein F. Seasonal variation in diet composition and similarity of sympatric red deer *Cervus elaphus* and roe deer *Capreolus capreolus*, *Wildlife Biology* 2008; 14 (2): 237-50.
- Thill, R. E. Deer and cattle diets on Louisiana Pine-Hardwood sites, *The Journal of Wildlife Management* 1984; 48 (3): 788-98.
- Tulloch, A.P. Chemistry of waxes of higher plants', in P.E. Kolattukudy (ed.), *Chemistry and biochemistry of natural waxes* (Elsevier Amsterdam), 1976; 235-87.
- Uvalle-Sauceda, J. Rehabilitación de áreas pastoreadas y sus efectos en comunidades vegetales y en las dietas de ungulados', (Universidad Autónoma de Nuevo León). 2001
- Vila A. R., Borrell L., Martínez L. Dietary Overlap Between Huemul and Livestock in Los Alerces National Park, Argentina', *The Journal of Wildlife Management*, 2010; 73: 368-73.
- Villarreal- Espino, O. A., Plata-Pérez F. X., Camacho-Ronquillo J. C., Hernández-Hernández J. E., Franco-Guerra F. J., Aguilar-Ortega B., Mendoza-Martínez G. D. ('El Venado Cola Blanca en la mixteca poblana', *Therya*, 2011; 2 (2): 103-10.
- Villarreal-Espino, O. A., Campos-Armendia L. E., Castillo-Martínez T. A., Cortes-Mena I., Plata-Pérez F. X., Mendoza-Martínez G. D. Composición botánica de la dieta del venado temazate rojo (*Mazama temama*), en la sierra nororiental del estado de Puebla', *Universidad y ciencia* 2008; 24 (3): 183-88.
- Wichatitsky M. de G., Roques-Rogery G. Rusa deer (*Cervus timorensis*) in New Caledonia: overview of current research and management perspectives, in Steven McLeod (ed.), *Proceedings of the National Feral Deer Management Workshop* (Canberra) 2005; 88-92.
- Willms W., McLean A., Tucker R., Ritcey R. Deer and Cattle Diets on Summer Range in British Columbia, *Journal of Range Management* 1980; 33 (1): 55-59.

Eficiencia ectomicorrizógena en especies de pino de Chihuahua con el uso de *Pisolithus tinctorius* (scop)

Miroslava Quiñónez Martínez^{1*}
Ivonne Estela Aguilar Moreno¹
Miguel Ángel Viveros Pinto¹
Neida Aurora Martínez Escobedo¹
Irma Delia Enríquez Anchondo¹
Toutcha Lebgue Keleng²
Fortunato Garza Ocañas³

RESUMEN

En Chihuahua se desarrolla una gran diversidad de hongos ectomicorrizógenos (HEM) participando en la conservación de sus bosques, encontrándose asociados a diferentes especies de pino de acuerdo con su capacidad forman parte del desarrollo de la planta. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad ectomicorrizógena a partir de una especie fúngica en plántulas de *Pinus arizonica*. Se recolectaron carpóforos de *Pisolithus tinctorius*. Se aplicaron tratamientos de 10, 15 y 20 ml de suspensión de esporas por inyección en el sustrato de cada especie de hongo en la plántula de pino. Se usaron 20 plántulas de pino inoculadas con el volumen de hongo y 10 como testigo. Las evaluaciones fueron las medidas morfométricas de las plantas de pino, antes y después de las inoculaciones. Se establecieron un total de 240 plántulas de pino. Se registró que *Pinus arizonica* presentó diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas, así como entre concentraciones.

1 Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

2 Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua.

3 Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León.

* Correos: mquinone@uacj.mx; e_novi@hotmail.com; ienrique@uacj.mx; tlebgue@uach.mx; fortunatofgo@hotmail.com.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrizógenos son aquellos que presentan la capacidad de asociarse hasta formar una simbiosis que comúnmente es llamada micorriza. Ofrecen a las plantas con las que se asocian diversas aportaciones positivas (Frioni, 2006). El término micorriza fue descrito por primera vez por el botánico Frank, en 1885, para describir un “órgano morfológico” dado por dos organismos en donde existe retroalimentación (Agarwal y Sah, 2009). Son un órgano complejo resultante de la simbiosis mutualista entre raíces de plantas vasculares y hongos del suelo, el hongo tiene la labor de invadir el córtex de la raíz, mientras que el meristemo apical y el cilindro vascular quedan intactos (Parláde, 1992). Las micorrizas son tan antiguas como las propias plantas y se conoce su existencia desde hace más de cien años; estimándose que aproximadamente el 95% de las especies vegetales conocidas establecen de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo (Honrubia, 2009). Estos hongos que se encuentran presentes en los suelos y que tienen esta asociación pertenecen a la división *Basidiomycota*, mientras que en casos más excepcionales se observan integrantes del grupo *Ascomycota*, y solo algunos pocos *Glomeromycota*, el cual es especialista ya que si se les priva de esta asociación perecen (Miller y Jastrow, 2000). Se pueden distinguir tres tipos fundamentales según la estructura que forman:

Endomicorriza

Los hongos que las colonizan penetran las células corticales, por lo que el manto exterior se encuentra ausente, forman como estructura secundaria vesículas alimenticias y arbusculos. Por ello a estos grupos se les conoce también como micorrizas Vesículo-arbusculares. Los hongos formadores de este tipo de micorrizas pertenecen a la división *Glomeromycota*, y se asocian principalmente con gramíneas (De Román y De Miguel, 1999).

Micorrizas Vesículo-Arbuscular

Se encuentra en condiciones naturales en la mayoría de los cultivos tropicales y subtropicales de interés agronómico (Keizer, 1994), y están presentes en la mayoría de las Angiospermas. La asociación simbiótica Micorrízica-Arbuscular se forma en muchas especies perennes leñosas, incluyendo muchas Gimnospermas aparte de las Pináceas (Morton y Benny, 1990). Estos hongos pertene-

cen al pequeño orden *Glomales* dentro de la clase *Zygomycetes* (Read, 2003).

Ectomicorrizas

Se caracterizan porque desarrollan una espesa capa de micelio sobre la zona cortical de las raíces absorbentes de la planta, las hifas del hongo no penetran las células corticales, sino que se ubican sobre y entre las separaciones de estas. Se pueden observar a simple vista (Figura 1). Este tipo de micorrización predomina entre los árboles de zonas templadas, se producen principalmente sobre especies forestales y leñosas, siendo especialmente característico en hayas, robles, eucaliptos y pinos. Los hongos que la forman son tanto *Basidiomycota* como *Ascomycota* (De Román y De Miguel, 1999; Tibbett y Sanders, 2002).

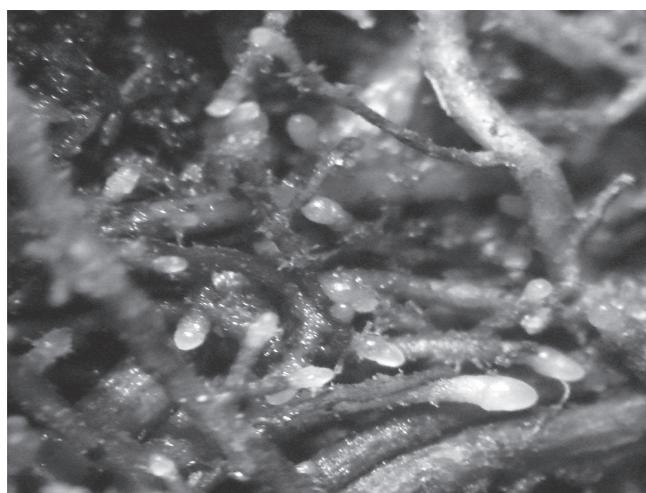


Figura 1. Raíces de pino micorrizadas con *Astraeus hygrometricus*

En cuanto a la anatomía de la ectomicorriza, las hifas de los HEM por lo regular se desarrollan en la superficie radical. La red de Harting es una característica primordial de esta asociación para la determinación de la ectomicorriza, puede desarrollarse en las primeras células corticales, o penetrar hasta le endodermis según el caso. El conjunto de hifas se extiende hacia los conductos permitidos por el suelo (Torres, 1989). Se caracterizan por la presencia de tres estructuras. Manto, Red de Harting y micelio externo (Smit y Read 2008). Respecto a la infección micorrízica, el micelio del hongo rodea la raíz formando un manto fúngico, y las hifas se desarrollan por los espacios intercelulares formando la llamada red de Hartig. Es frecuente la aparición de otras estructuras

externas tales como cistidios, hifas que emanan o rizomorfos (Figura 2). La detección de las ectomicorizas es relativamente sencilla gracias al cambio morfológico que sufre la raíz (De Román y De Miguel, 1999). En este proceso se establece una interfase de contacto íntimo entre hifas y células vegetales, donde se produce el intercambio de nutrientes de manera bidireccional, los nutrientes minerales son transvasados disueltos en agua desde el hongo a la planta, mientras esta cede al hongo los azúcares procedentes de su actividad fotosintética (Barea, 2004).

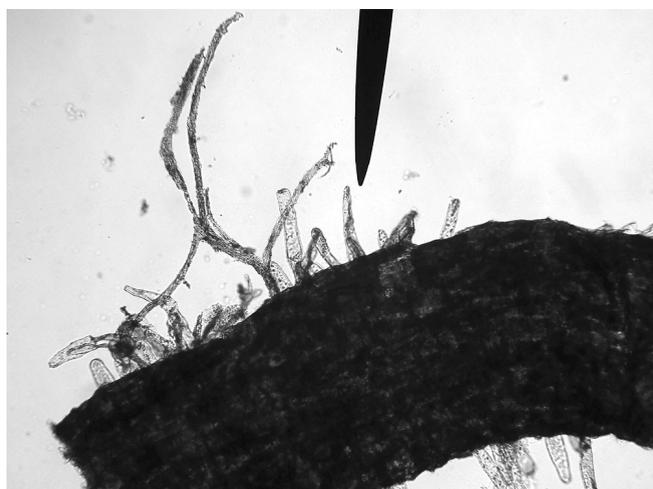


Figura 2. Cistidios e hifas de HEM en raíz de *Pinus arizonica*

BENEFICIOS DE LA MICORRIZACIÓN:

Aumento a la captación de nutrientes y agua

La resistencia a condiciones de sequía, ya que participa directamente en la captación de agua de las zonas secas (Duñabeita, 1994). Este efecto se presenta principalmente en plantas jóvenes, también permite la absorción de nutrientes difíciles para de absorber por las raíces de las plantas, por ello las plantas micorrizadas presentan mayor tolerancia al estrés ambiental.

Producción de reguladores de crecimiento.

Se presenta la producción de hormonas estimulantes del crecimiento (auxinas, citoquininas, gibberelinas, y tiaminas) que benefician directamente al huésped (Urizar, 1999; Cuesta, 2009).

Almacenamiento de nutrimentos.

Este proceso se lleva a cabo propiamente en el manto fungoso en el cual se pueden presentar cantidades más elevadas de nitrógeno, fósforo, potasio,

magnesio, cobre, sodio, silicio, zinc, aluminio y boro que serán absorbidos cuando la palta los requiera.

Protección contra enfermedades y patógenos.

Los hongos ectomicorrízicos compitan en espacio y tiempo con diversos hongos patógenos de la rizosfera (barrera física), así como la producción de compuestos fúngicos y antibióticos que puedan eliminar al patógeno en caso de que logre establecerse en las plantas (Cuesta, 2009).

PRINCIPALES ESPECIES DE PINO DE IMPORTANCIA MADERABLE EN CHIHUAHUA

Pinus arizonica:

Nombre común pino amarillo (E.U), pino chino o cenizo (México). Árbol monoico con altura de 25 a 33 m y diámetro mayor a 100 cm., copa densa y piramidal en árboles jóvenes y redondeados en árboles maduros. La corteza es gruesa, con profundidad de fisuras que forman placas largas e irregulares de color café rojizo. Hojas en fascículos de tres o cuatro agujas. Los frutos son conos ovoides a cónicos, simétricos, erguidos de seis a nueve cm de largo color café oscuro con tinte rojizo (Perry, 1991).

Pinus durangensis:

Nombre común: alazán (México). Árbol recto de hasta 40 cm de altura, copa redondeada y compacta en los árboles maduros, con ramas péndulas a horizontales, frecuentemente sigmoideos; árboles jóvenes con copa de forma cónica. Hojas en fascículos, corteza rugosa dividida en grandes placas escamosas de color café oscuro, café pálido en la parte media y separado por fisuras. Conos ligeramente curvados, ovoides de 6 a 10 cm de largo (Pompa *et al.*, 2009).

IMPORTANCIA DE LA MICORRIZACIÓN EN PINOS DE CHIHUAHUA

El estado de Chihuahua cuenta con la mayor extensión territorial en México, así como de la superficie forestal y arbórea, sus bosques están integrados por diversas especies de pino y encino (Pinedo *et al.*, 2007). Por ello están siendo sometidos a la explotación de madera sin la utilización de un buen programa de aprovechamiento, se reportan por año aproximadamente la devastación de 1943 hectáreas (Escárpita, 2002).

Esta deforestación tan acelerada y destructiva ha provocado que el estado pierda su categoría

de líder en la producción de madera. Es necesario buscar estrategias para la recuperación de los bosques deforestados mediante la siembra de individuos. Una de las formas de incrementar su supervivencia en estas condiciones es a través de la inoculación de hongos ectomicorrizógenos (HEM) por los múltiples beneficios que aportan. Los HEM son una relación simbiótica mutualista que ocurre entre las raíces de las plantas y el micelio que es producido por los hongos (Garza, 1991). El hongo rodea las raíces secundarias de las plantas formando una red de hifas entrelazadas llamado manto; intercelularmente, rodea a las células corticales formándose la red de Hartig (Smith y Read, 1997). El rol fundamental de los HEM es: mejorar la capacidad de absorción de agua y de elementos esenciales del suelo nitrógeno, fósforo principalmente (Pennane y Heiskanen, 2005), tolerancia a altas temperaturas y valores extremos de pH (Madrid, 2005), así como mayor resistencia al ataque de patógenos y depredadores (Campos, 2009), Además de estimular su crecimiento por medio de la producción de hormonas (auxinas, fitoquininas). También permite a las raíces explorar mayor volumen de suelo, mantener la actividad de las raíces más tiempo (Miller y Jastrow, 2000); por ello, son considerados un grupo clave funcional en la regulación de los nutrientes que circulan entre el suelo y las plantas en la mayoría de los ecosistemas de bosque de coníferas formando una simbiosis. Los hongos verdaderos son ubicuos y cumplen con una función ecológica importante, particularmente aquellas asociadas con los procesos de reciclamiento de carbono y nutrientes en el suelo (Anderson y Cairney, 2004). Se estima que a nivel mundial 5400 especies de hongos forman asociación ectomicorrízica con la mayoría de las familias de las plantas de bosque (ejem. Betulaceae, Fagaceae, Pinaceae, Myrtaceae, (Molina *et al.*, 1992). Los HEM también dependen en gran medida de su planta hospedera para los carbohidratos y los niveles de infección micorrízica han sido fuertemente asociados a la cantidad de luz disponible y por lo tanto la producción de fotosintato por la planta. El ambiente de la luz puede también influir en como la presencia del hongo ectomicorrízico exhibe un alto grado de especificidad ecológica. No obstante, poco es conocido del rol ecológico de los diferentes hongos en la regeneración de la cobertura abierta, solo deja el mecanismo por el cual ellos operan (Ingleby *et al.*, 1998).

Los HEM proveen una mayor unión entre el carbono fijado por productores primarios y otros niveles tróficos en el ecosistema. Por ejemplo, varias especies de roedores dependen del 90% de los cuerpos fructíferos para su dieta (Maser *et al.*, 1978). Ungulados, bacterias, artrópodos y otras especies de hongos también usan o dependen de los esporocarpos de HEM como una fuente de alimento y quizá de micronutrientes.

Algunas especies de hongos y trufas formados por hongos ectomicorrizógenos son importante fuente de alimento por pequeños mamíferos y algunas especies son colectadas para su comercialización (Wienscyk *et al.*, 2002).

Se han realizado estudios con diferentes especies de hongos y pinos, como los de Carrera (1997), cuyo objetivo fue medir la eficiencia de HEM en *P. patula*. Asimismo, Perea *et al.* (2005) registraron la influencia de la humedad, nitrógeno y HEM sobre el crecimiento de un pino infiriendo que la inoculación con *Hebeloma spp* y *Laccaria spp* daban una mayor respuesta al crecimiento de la planta, generando un mayor peso seco total y altura (25%). En los bosques de la Sierra Tarahumara del estado de Chihuahua, existe una gran diversidad de hongos ectomicorrizógenos (Quiñónez *et al.*, 2005), sin embargo, son pocos los estudios sobre el uso y eficiencia de estas especies silvestres en los programas de producción de plántulas de pino que crecen en dichos bosques.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de *Pisolithus tinctorius* con capacidad ectomicorrizógena en el crecimiento de *Pinus arizonica*, cuya especie vegetal es la de mayor densidad en el municipio de Bocoyna, Chihuahua, y de mayor importancia maderable.

MÉTODO.

Se utilizaron semillas de las especies de *Pinus arizonica* las cuales fueron sumergidas en 20 litros de agua destilada por ósmosis inversa agregando 10 gramos de fungicida (Captan Mr), manteniéndolas en reposo durante 24 horas, esto fue con la finalidad de evitar la contaminación por hongos, o algún otro patógeno. Transcurrido el tiempo de reposo se eliminaron las semillas flotantes (banas), rescatando 200 semillas de cada especie dejándolas secar a temperatura ambiente. La siembra se realizó en charolas de unicel con 77 cavidades con capacidad de 170 ml (Figura 3), fueron llenadas con peat- moss para tener un medio

nutritivo en las cavidades de las charolas, se colocó una capa de 10 cm de peat- moss agregando un poco de agua destilada para humedecer el sustrato, las cajas se golpearon suavemente para el asentamiento del mismo. Las semillas se colocaron a tres centímetros de profundidad en las cavidades (Niembro, 1980), cubriéndolo completamente con sustrato (Martínez *et al*, 2009). Las plántulas obtenidas se mantuvieron en el invernadero, con riegos cada dos o tres días hasta su posterior inoculación.

La colecta de semillas de pino fue proporcionada por la Unidad de Manejo Forestal de San Juanito, Chihuahua, quien realizó la colecta de semillas en bosques del municipio de Bocoyna, a 220 km al sureste de la ciudad de Chihuahua, México, ubicada entre las coordenadas 28° 00' 41'' y 27° 53' 38'' latitud norte y los 107° 35' 39'' y 107°35'37'' longitud oeste presentando una altitud de 2427 a 2442 msnm. Bocoyna tiene una superficie de 2801.80 km² ocupando el quinto lugar por superficie en el estado, presenta una temperatura media anual de 10.5°C así como una precipitación promedio anual de 685 mm (Figura 4).



Figura 3. Charolas con plántulas de *Pinus arizonica*

Las comunidades vegetales se clasifican como bosque pino-encino y bosque de encino-pino en los cuales los taxos representativos son: *Pinus arizonica*, *Pinus engelmannii*, *Pinus ayacahuite*, *Quercus sideroxylla*, *Quercus depressipes*, *Juniperus deppeana*, *Arbustus arizonica* y *Arctostaphylos pungens* (Quiñónez *et al.*, 2008).

En cuanto a el hongo *Pisolithus tinctorius*, fue adquirido por una empresa comercial cuyo produc-

to marca ectoRIZE fue usada siguiendo las especificaciones del vendedor, debido a que su abundancia fue baja en las zonas de colecta (Figura 5).



Figura 4. Zonas de regeneración forestal del municipio de Bocoyna, Chih.



Figura 5. Esporóma de *Pisolithus tinctorius*

Procesamiento del inoculo fúngico de *Pisolithus tinctorius*. Antes de realizar el inóculo esporal se midió el número de esporas/ml., para lo cual fue utilizada la cámara de Neubauer. Para esto, se agregó 0.01 gr de esporas en 1 ml de agua destilada o solución de KOH y unas gotas de azul de metileno para tinción de las esporas. Se incubaron a 37°C durante dos horas para la homogenización de las esporas, agitándose con ayuda de un vortex, para posteriormente hacer el conteo de número de esporas por ml.

Inoculación micorrízica. El trabajo se llevó a cabo en el invernadero de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Se tomaron 20 plántulas de pino para ser inoculadas con un volumen de 0, 5, 10 y 20 ml de hongo. Un mes después se realizó una nueva inoculación para obtener un mejor resultado. En total se obtuvieron 20 individuos de la especie de *P. arizonica* por cada volumen evaluado más el testigo, obteniéndose un total de 80 plántulas de *P. arizonica* evaluadas. Finalmente, se realizó la evaluación de las medidas morfométricas de *P. arizonica* que se realizaron antes (primer mes de crecimiento), y después de la inoculación a los seis meses consecutivos para obtener las diferencias de crecimiento. Los principales parámetros de medición fueron: altura de la planta, ancho del follaje y longitud de la raíz.

N° de tratamiento	Volúmen	Clave de referencia
1	0	T (Control)
2	5	PT.5
3	10	P.T.10
4	20	P.T.20

Tabla 1. Tratamientos de diferentes concentraciones de *Pisolithus tinctorius* en raíz de Plántulas de *Pinus arizonica*.

Análisis estadístico. Los parámetros obtenidos fueron usados en el programa SPSS 17.0 para realizar un ANOVA y encontrar las diferencias significativas correspondientes. Posteriormente se realizó la prueba de comparación múltiple de medias Tukey ($\alpha < 0.05$) para comparar los promedios de medidas morfométricas y obtener las asociaciones más representativas.

Estudio de correlación. Se obtuvo el coeficiente de determinación entre el crecimiento de la plántula (medidas morfométricas) en relación al porcentaje de micorrización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se establecieron un total de 80 plántulas de pino de las semillas sembradas bajo condiciones de invernadero correspondientes a *Pinus arizonica*, inoculando 20 plantas de cada volumen. Se colectaron los datos de las variables: altura total, ancho del follaje y longitud de raíz. Posteriormente se evaluaron las diferencias significativas para cada nivel de hongo, estos parámetros fueron recopilados durante seis meses consecutivos para permitir la infección de las raíces. De acuerdo con los modelos estadísticos y tomando en cuenta los cuatro tratamientos, se procedió al análisis de cada una de las variables.

El análisis de varianza para *Pinus arizonica* mostró diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas, así como entre tratamientos y el coeficiente de determinación (r^2) indicó que el 97.95% de la variabilidad en diámetro de cuello de raíz, es explicado por el efecto positivo de la inoculación de HEM, seguido de la altura del tallo con un 94.6% de variabilidad (Tabla 2).

PARÁMETROS	P<0.05	S _x	r ²
Ancho del Follaje	0.00*	2.68	92.34%
Longitud de la raíz	0.00*	1.60	97.95%
Altura total de la plántula	0.00*	3.10	90.57%

Tabla 2. ANOVA y coeficiente de determinación de parámetros en *Pinus arizonica* sobre la inoculación de diferentes volúmenes de *Pisolithus tinctorius* y un testigo.

r^2 =Coeficiente de determinación, S_x =Error estándar, $P < 0.05$ = significancia

En el análisis de varianza (Tabla 2) se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, por lo que se realizó la prueba múltiple de medias (Tukey), para la comparación de cada uno de los parámetros.

Respecto a la altura promedio total de las plántulas, la significancia fue dada principalmente por el volumen de 10 ml. El comportamiento de crecimiento para volúmenes de 5 y 20 ml fue muy similar y los valores más bajos fueron las del testigo (Figura 6).

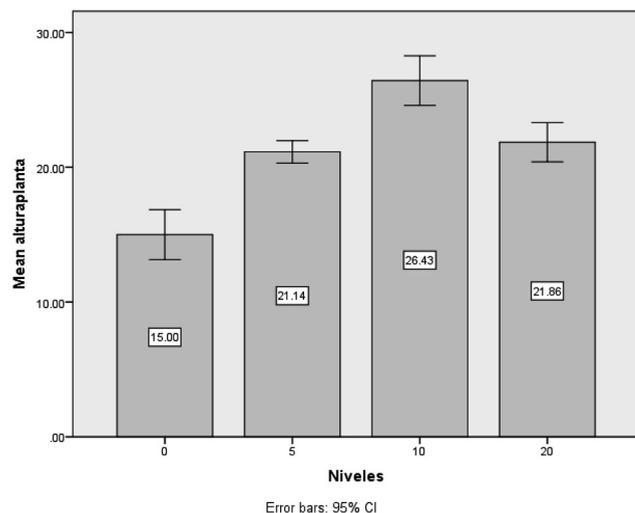


Figura 6. Promedio de altura de la plántula de pino a diferentes volúmenes de esporas.

Respecto a la anchura del follaje, se registró que las plantas con un tratamiento de 20 ml de volumen adicionado tuvieron los mayores valores, seguido por casi tres centímetros de diferencia al tratamiento de 10 ml. Los volúmenes de 0 y 5 ml se comportaron con un crecimiento bajo. Los resultados sobre longitud de raíz se comportaron de la misma manera que la altura de la planta, fueron de mayor crecimiento en volúmenes de 10 ml, un crecimiento con valores intermedios en 5 y 20 ml y en el testigo los valores de menor crecimiento (Figura 7-8).

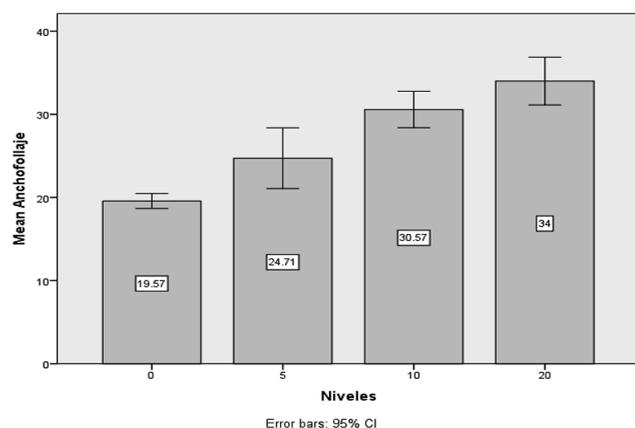


Figura 7. Promedio de anchura del follaje de *Pinus arizonica* a diferentes volúmenes de esporas.

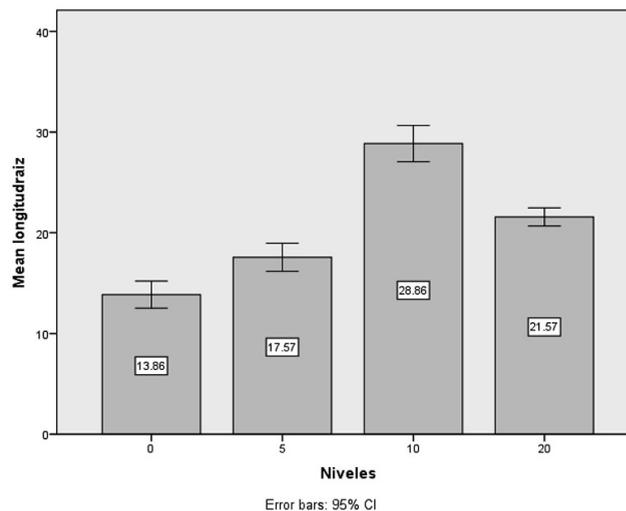


Figura 8. Gráfica de longitud de raíz promedio de *Pisolithus tinctorius* en *Pinus arizonica*.

La simbiosis micorrízica es una estrategia nutricional que han desarrollado la mayoría de las plantas y algunos hongos que les asegura un beneficio mutuo, garantizando la mayor sobrevivencia en campo con el uso de plantas micorrizadas. Los resultados muestran que *Pisolithus tinctorius* es una especie que puede tener un efecto de micorrización sobre la raíz de las especies de pinos estudiadas, reportándose los mejores resultados en la concentración en 10 y 20 ml para las variables de medición en la plántula de *Pinus arizonica*. Algunos estudios han demostrado esta eficiencia como los de Barcenás *et al.*, (2000), que evaluaron el índice de micorrización entre algunas especies de ectomicorrizas silvestres y *Pisolithus tinctorius* (comercial), en la supervivencia, crecimiento y desarrollo de plántulas de *Pinus durangensis*, *P. cooperii* y *P. engelmannii*, en plantaciones de cuatro y cinco años, cuyos resultados mostraron diferencias significativas en altura, siendo *Pinus durangensis* la de mayor supervivencia (91.7%) al ser inoculada con *Pisolithus tinctorius*. Algunas ventajas del crecimiento y sobrevivencia de hongos micorrizicos y sus hospederos están descritas como una alternativa biotecnológica para hacer posible la compatibilidad entre la producción forestal y la conservación ambiental. La propagación por micelio de los hongos micorrizicos es apoyado en el laboratorio o en cultivos de viveros de árboles para ser usado en la inoculación de plantas coníferas (Cruz, 1999).

CONCLUSIÓN

La obtención de resultados positivos de micorrización para las especies fúngicas ectomicorrizas evaluadas se confirma la compatibilidad de las mismas para la formación de ectomicorrizas sobre *Pinus arizonica*. Se presentó un coeficiente de determinación en todas las variables calculadas por encima del 90%, lo que nos indica la efectividad de la técnica aplicada. *Pisolithus tinctorius* respondió favorablemente a la respuesta de micorrización en *Pinus arizonica*. Aparentemente, estos resultados indican que un volumen de 10 ml *Pisolithus tinctorius* inoculándose en la raíz de la plántula puede generar buenos efectos de micorrización, aunque es importante recordar que el recurso fúngico usado fue comercial y no silvestre.

Algunas ventajas del crecimiento y sobrevivencia de hongos micorrízicos y sus hospederos están descritas como una alternativa biotecnológica para hacer posible la compatibilidad entre la producción forestal y la conservación ambiental. La propagación por micelio de los hongos micorrízicos es apoyado en el laboratorio o en cultivos de viveros de árboles para ser usado en la inoculación de plantas de coníferas, por ello es importante continuar con los estudios de micorrización en la búsqueda de las especies más favorables en la producción forestal de Chihuahua.

La utilización de charolas de unicel más peatmoss es efectiva para la producción de plantas micorrizadas, ya que facilita la extracción y manejo de plantas para su estudio de observación. Sin embargo, es imprescindible realizar investigaciones sobre el comportamiento en campo de plántulas inoculadas, para comparar el incremento y desarrollo de las mismas frente a plantas sin inocular. Por ello, es aconsejable monitorear con mayor precisión la evolución de la micorriza a través del tiempo para evaluar en qué momento se establece. Asimismo, considerar algunos parámetros importantes tales como temperatura, pH, incidencia de luz, etcétera, que influyen en el desarrollo de estas especies y las condiciones aunque a nivel invernadero son diferentes en ciudades calurosas y desérticas que las presentes en la Sierra Tarahumara de Chihuahua.

LITERATURA CITADA

- Agarwal P; and Sah. P. 2009. Ecological importance of ectomycorrhizal in world forest ecosystems. *Nature and Science* 7(2): 107-116.
- Anderson I.C. y J.W.G. Cairney. 2004. Diversity and Ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 6(8):769-779.
- Arora, D. 1990. *All that the Rain Promises, and More*. Berkeley, California 257pp.
- Barron, G. 1999. *Mushrooms of northeast north America*. Midwest to new england 336pp.
- Barea, J.M. y Honrubia, M. 2004. La micorrización dirigida de la planta forestal. In: Vallejo, R. y al. (ed.), *Avances en el estudio de la gestión del monte mediterráneo*. CEAM. 84-921259-3-4. Pp: 215-260.
- Carrera, A. 1997. Inoculación con hongos ectomicorrízicos en *Pinus patula Schl et Cham* y *Pinus greggii Engelm* en vivero. *Boletim de Pesquisa Florestal* 34: 99-101.
- Carrera, N.A y López G.A. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo*. Serie de ciencias forestales y del ambiente. 10(2): 93-98.
- Carrera, N. 2009. Inoculación con hongos ectomicorrizogénos en *Pinus patula Schl et Cham* y *Pinus greggii Engelm* en invernadero. 44pp.
- Campos, N. 2009. Medición de la respuesta a la inoculación de dos especies de hongos ectomicorrizogénos en tres especies de pinos de la Sierra Tarahumara.
- Carrasco, H. 2010. Aspectos ecofisiológicos de la raíz de *Pinus pseudostrobus* y *P.patula* y especies ectomicorrízicas comestibles de *Helbeloma spp* y *Laccatia spp*. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Campus Montecillo.
- Cuesta, J. 2009. Ecología de los hongos (2a parte) hongos micorrízicos. http://www.forestales.net/archivos/forestal/pdfs%2024/ecologia_hongos_2.html
- Daniele, D., Becerra, A., Crespo, E. 2005. *Amanita muscaria* (Basidiomycota) y su asociación micorrízica con *Cedrus deodara* (Pinaceae) en las Sierras de Córdoba, Argentina. 40(1-2).
- De Román, M., De Miguel, A. 1999. Identification and description of natural mycorrhizae in a potential truffle-occurring area. Proceedings of the V Congress on Science and Cultivation of Truffle and other Edible Hypogeous Fungi (in press).
- Dominguez, I., Albizu, C., Garbisu, I. 2004. Vegetation diversity and vertical structure as indica-

- tors of forest disturbance. *Forest Ecology and Management* 195:341-354
- Duñabeitia, M.D. 1994. Effect of Inoculation with *Laccaria bicolor* on Drought Tolerance and Field Outplanting of Douglas-Fir Seedlings. Mycorrhizas in Integrated Systems from Genes to Plant Development. Proceedings of the fourth European Symposium on Mycorrhizas. Granada, Spain.
- Escárpita, H. 2002. *Situación actual de los bosques de Chihuahua madera y bosques, primavera*. Instituto de Ecología A.C. Xalapa, México. 8:3-18.
- Fiore, D. 2001. Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytologist* 152: 533-542.
- Garza, F. 1991. Competition between ectomycorrhizal fungi for establishment on the roots of some tropical pines. University of Oxford, England. D.Phil. Thesis.
- Honrubia, M. 2009. *Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años*. Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Facultad de Biología, Campus de Espinardo Universidad de Murcia, España 66(1): 133-144
- Keizer, P.J, Arnolds E. 1994. Succession of ectomycorrhizal fungi in roadside verges planted with common oak (*Quercus robur* L.) in *Drenthe, The Netherlands*. *Mycorrhiza* 4: 147-159.
- Madrid, J. 2005. Evaluación del efecto de aplicar tres concentraciones de esporas del hongo micorrizico *Pisolithus* sp. y tres intervalos de aplicación sobre la especie *Pinus caribaea* var. hondurensis nivel de vivero en machaquila, poptun, peten.
- Martínez, L. Pérez, L. Hernández, C. Santiago, G. Guerra, V. y Legorreta, F. 2009. *Manual para la propagación y micorrización de plantas arbustivas silvestres para la restauración de suelos degradados*. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Centro de investigación de ciencias biomédicas.
- Medina, N. 1999. *Nutrición mineral con N, P y K en la simbiosis de hongos* 23(4) 83-88p.
- Molina R., H.B. Masicote y J. M. Trappe. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-ecological consequences and practical implications. In *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, New Cork, N.Y. pp. 358-423.
- Miller, R. M. y Jastrow J. D. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. En: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function* (Y Kapulnik y DD Douds Jr, eds), pp 3-18. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Morton, J., Redecker, D. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93:181-195.
- Parlade, I. 1992. *Técnica de inoculación de Abeto de Douglas (Pseudotsuga menziesii) de hongos ectomicorrizicos y sus aplicaciones en reforestación*. España, Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biología. 200p.
- Perry, J. 1991 The of pines of Mexico and Central America portland. Oregon E.U. 231p.
- Pennanen, T. J. Heiskanen, T. 2005. Dynamics of ectomycorrhizal fungi and growth of Norway spruce seedlings after planting on a mounded forest clearcut. *Forest Ecology and Management*. 213:243-252.
- Perea, E., Pérez, M., Isla de Bauer, M., Fenn, M., Trinidad, S., Hernández, T. 2005. Fertilización, tipos de suelo y hongos micorrizicos y endófitos radicales asociados al eucalipto *TERRA Latinoamericana*, vol. 23, Núm 2. 201-212pp Universidad Autónoma Chapingo México
- Pinedo, A., Pinedo, A., Quintana, M., Martínez, S. 2007. Análisis de áreas deforestadas en la región centro-norte de la Sierra Madre Occidental, Chihuahua, México. *Medio ambiente y desarrollo sustentable*, vol. 1, No. 1, Pp. 36-43.
- Pompa, G., Marín, H., Ciro, P., Ruiz, J. 2009. Modelación del volumen fustal de *Pinus durangensis* en Guachochi, Chihuahua, México Madera y Bosques, Instituto de Ecología, A.C. Vol. 15, Núm. 1, pp. 61-73.
- Quiñónez, M., F. Garza, M. Sosa, T. Keleng, L., Lavín P. 2008. Índices de diversidad y similitud de hongos ectomicorrizógenos en bosques de Bocoyna, Chihuahua, México. *Ciencia Forestal en México*, vol. 33. 103:59-78.
- Quiñónez, M., Garza, F. Vargas, M. 2005. Aspectos ecológicos y diversidad de hongos ectomicorrizicos en bosque de pino y encino de 5 localidades del municipio de Bocoyna, Chihuahua. *Ciencia en la frontera*. Vol. III. Núm. 1:29-38.
- Read, D.J. y Pérez, M. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems-a journey

- towards relevance? *New Phytologist* 157 : 475-492.
- Smith, S. y Read, D. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Structure and development of ectomycorrhizal roots. *Academic*, New York, pp. 161-290.
- Smith, S. y Read, D. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3er Ed. Academic Press. 800 pp.
- Torres, H. 1989. *Aislamiento, identificación y evaluación de hongos ectomicorrizales de Pinus sp de la cuenca del río Villa Lobos*. Departamento de Guatemala. Tesis de Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 43.p
- Tibbett, M. and Sanders, F. 2002. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany* 89:783-789.
- Urizar, M.G.1999. Eficiencia en la producción de Micorrizas y aumento de la biomasa en Pino candelillo (*Pinus maximoi*) H.E. Moore) Con *Laccaria laccata* (Scop. Ex. Fr.Bk. E.Br.) *Pisolithus tectorius* (Pres, Coker y Couch) y *Scleroderma* sp. (Per) en contenedor. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 50 p.
- Vázquez, M. Azcón, R. 2011. Compatibility of a wild type and its genetically modified *Sinorhizobium* strain with two mycorrhizal fungi on *Medicago* species as affected by drought stress. Volume 116.
- Vázquez, G., Santiago, M., Estrada, T. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizales. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, *Serie Botánica* 73: 1-15.
- Wiensczyk A. M., S. Gamiel, D.M. Durall, M. D. Jones, S. W. Simard. 2002. Ectomycorrhizae and forestry in British Columbia: A summary of current research and conservation strategies. *B.C. Journal of Ecosystems and Management*. Volume 2, Number 1:1-20.

Respuesta agronómica y edáfica a la aplicación de biosólidos en el cultivo algodonerero en el Valle de Juárez, Chihuahua

Juan Pedro Flores Márquez^{1}*
Baltazar Corral Díaz¹
Pedro Osuna Ávila¹
Ana Irene Flores Arras²

RESUMEN

Realizar un reciclaje natural, reducir el confinamiento de los biosólidos en el relleno sanitario municipal, reducir los costos de producción agrícola y mejorar los suelos, fueron los motivos que impulsaron esta investigación. La evaluación del efecto de los biosólidos en la respuesta agronómica del algodonerero y propiedades del suelo en el Valle de Juárez, Chihuahua, se realizó en la parcela del Rancho Universitario de la UACJ. La producción de algodón no fue diferente significativamente entre el suelo tratado con biosólidos y el control con fertilizante químico, mientras que la calidad de fibra como longitud y finura se incrementaron con el fertilizante. El índice relativo de clorofila, el número de plantas y altura de planta no variaron significativamente entre los tratamientos. La formación de bellotas y el total de frutos no fueron afectados, pero el porcentaje de precocidad fue mayor en el suelo tratado con biosólidos. El análisis económico reflejó un ahorro de 3260 pesos en el costo de producción de algodonerero para el suelo tratado con biosólidos. La salinidad y alcalinidad del suelo no se modificaron significativamente con la aplicación en dosis agronómica de biosólidos, pero aumentó la concentración de nutrientes como fósforo y nitrógeno total del suelo.

Palabras clave: Lodos residuales, suelos, fibra, fósforo, nitrógeno.

¹ Departamento de Ciencias Químico Biológicas, ICB, Universidad Autónoma de Cd Juárez, Chihuahua, México

² Servicios Agropecuarios Paso del Norte S.C.

* Autor responsable, Juflores@uacj.mx, Anillo envolvente del PRONAF y calle Estocolmo s/n, Zona PRONAF, Ciudad Juárez, Chih, México. CP 32310; Teléfono: 656 395 9420.



Figura 1. Localización de las parcelas para evaluación de biosólidos en el Valle de Juárez, Chihuahua, México.

INTRODUCCIÓN

Las dos principales plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en Ciudad Juárez, Chihuahua, procesan anualmente en promedio 91 millones de metros cúbicos de aguas negras y 105 mil metros cúbicos de biosólidos digeridos anaerómicamente, los cuales tienen 70% de humedad (CAR-Degremont, 2016). La disposición adecuada de los biosólidos es un asunto ambiental, productivo y de salud que es atendido por las prioridades de la COCEF y US-EPA al promover la gestión integral de materiales, la gestión de residuos y la limpieza de sitios: residuos especiales como el lodo residual de las PTAR, en especial usos productivos para los lodos o biosólidos en la región del Valle de Juárez, Chihuahua, frontera con El Paso, Texas (COCEF, 2016; <http://www.cocef.org/>).

Actualmente, la disposición de los lodos residuales ha sido tanto al relleno sanitario municipal como a un terreno de confinamiento cercano al sur de la ciudad y una fracción pequeña del volumen generado es aplicada en suelos agrícolas. El problema del almacenamiento de estos residuos en lugares no apropiados o acondicionados, como en este caso del relleno sanitario, ha sido ampliamente documentado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA, 1994) en el sentido de

que pueden ocurrir lixiviados que contaminen el acuífero, la atracción de vectores de enfermedades como roedores y perros u otras mascotas sin control que pueden diseminar plagas y enfermedades existentes en estos residuos, así como la dispersión de partículas al aire y malos olores, lo cual es común en esta región por la ocurrencia de tolveneras intensas que afectan la salud de dos millones de habitantes en la región Paso del Norte (Flores *et al.*, 2014).

ANTECEDENTES

Una de las alternativas de solución al manejo y disposición de lodos residuales o biosólidos utilizadas en Estados Unidos y muchos países del mundo, ha sido el uso de biosólidos como fertilizante orgánico y mejorador de suelos agrícolas, lo cual permite reciclar los nutrientes y materiales orgánicos en un sistema natural con beneficios ambientales y económicos (Cogger, *et al.*, 2001). Los antecedentes de investigación en el Valle de Juárez, Chihuahua, sobre el uso de biosólidos en suelos agrícolas iniciaron en 1999; en este estudio se trajeron biosólidos de El Paso, Texas, ya que las dos principales PTAR en Ciudad Juárez estaban en construcción, los resultados fueron favorables en el cultivo de algodón (Figuroa *et al.*, 2008). A partir de 2001,

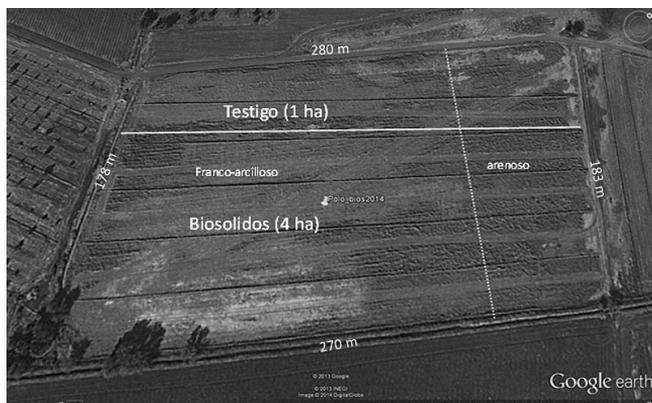
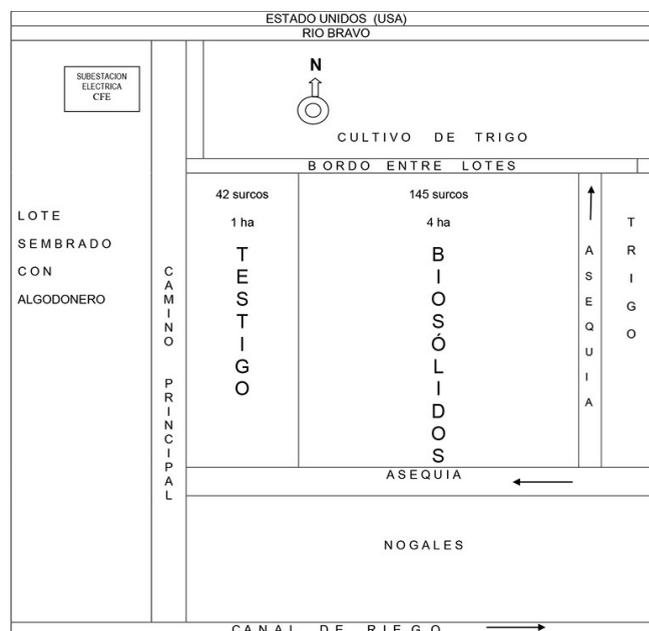


Figura 2. Croquis de los tratamientos testigo (1 ha) y biosólidos (4 ha) en una de las parcelas del estudio algodonero en San Isidro, municipio de Juárez.

las PTAR empezaron a producir un volumen considerable de biosólidos estabilizados con cal (15%), estos fueron evaluados en un suelo cultivado con avena forrajera. El resultado indicó que es posible considerar una tasa de mineralización de 20% del nitrógeno orgánico de los biosólidos incorporados al suelo en el ciclo agrícola otoño-invierno (Flores *et al.*, 2007). Sin embargo, otro estudio realizado con diferentes suelos del Valle de Juárez, donde se aplicó el mismo tipo de biosólidos encalados, reportan que la mineralización de nitrógeno orgánico con la técnica de resinas sintéticas fue de 10% como primera aproximación para cálculos de dosis. Sin embargo, en otros estudios locales con el método de la diferencia de nitrógeno total en suelos agrícolas indican mineralización entre 20 y 30% (Flores *et al.*, 2010). El impacto de biosólidos y aguas residuales en la cadena alimenticia del Valle de Juárez también ha sido analizado y se ha concluido que no existe acumulación de metales pesados en tejido de borregos pastoreados en suelos cultivados con avena forrajera, irrigados con aguas residuales y aplicación de biosólidos estabilizados con cal. Sin embargo, se requieren más estudios de al menos dos años para evaluar la posible transferencia y acumulación de metales en estas condiciones productivas (Flores *et al.*, 2013).

Al respecto, la más reciente experiencia exitosa fue una parcela de una hectárea sembrada con trigo en el ciclo agrícola 2012-2013 en el Ejido San Isidro del Valle de Juárez, Chihuahua (Flores y Méndez, 2013), donde se aplicaron biosólidos de Ciudad Juárez para iniciar un programa piloto como alternativa de solución a dicha problemática, la cual fue apoyada



por la Empresa Concesionaria de Aguas Residuales-Degremont y conducida por la Empresa SAPN. No obstante que se obtuvieron buenos resultados en dicha parcela productiva, al demostrar la factibilidad del reciclaje natural de biosólidos y contribuir a la solución del problema, el esfuerzo realizado no fue suficiente, ya que varios agricultores al estar convencidos de los beneficios logrados, solicitaron que se continuara la aplicación y demostración para reciclar los biosólidos que genera la ciudad. Por esta razón, el presente proyecto es de suma importancia para dar continuidad y fomentar a nivel extensivo entre los productores agrícolas y la ciudadanía las ventajas productivas, económicas y ambientales de llevar a cabo aplicaciones de biosólidos en suelos agrícolas, así como formar un Comité de Utilización de Biosólidos que permita vigilar y dar cumplimiento a la Norma Mexicana en materia de lodos y biosólidos (Semarnat NOM-004-ECOL-2002), lo cual será benéfico al reducir considerablemente el confinamiento de lodos residuales y sus efectos negativos a la salud humana y ambiental de la región fronteriza.

OBJETIVOS

Los objetivos del estudio fueron determinar la respuesta agronómica del algodonero al uso de biosólidos en terrenos a nivel comercial del Valle de Juárez con manejo de campo representativo y determinar el efecto de los biosólidos en las propiedades físicas y químicas del suelo, así como en la rentabilidad del cultivo de algodonero enfocada en la reducción de



Figura 3. Muestreo y secado de suelos y biosólidos en las parcelas de evaluación del Valle de Juárez.



Figura 4. Aplicación de biosólidos en la parcela del municipio de Praxedis para la siembra de algodón.

fertilizantes químicos y en los beneficios al suelo y ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se realizó en áreas agrícolas del Valle de Juárez, Chihuahua, localizado entre los 31° 37' y 31° 07' de Latitud Norte, y entre los 106° 41' y 105° 39' de Longitud Oeste, a una altitud promedio de 1120 metros sobre el nivel medio del mar. El estudio consistió en una parcela de cinco hectáreas que fue seleccionada con base en suelo y condiciones productivas representativas para llevar a cabo la evaluación, demostración y difusión de las ventajas de reciclar los biosólidos en agricultura.

La parcela o sitio de evaluación estuvo a una distancia de 65 km de la PTAR Sur localizada en Zaragoza (Figura 1). Además se trató que la parcela tuviera suelo representativo, lo cual fue de utilidad para avanzar en generar información para un programa sustentable de disposición de biosólidos. La parcela fue inspeccionada para comprobar los lineamientos sugeridos por la EPA para sitios factibles de aplicación y lo indicado por la Norma que legisla el uso de biosólidos en México (NOM-004-SEMARNAT-2002). Entre los criterios a utilizar para esto fue que no estuvieran cerca de

áreas habitacionales, que no tengan tipos de suelos extremos con problemas de drenaje, salinidad, sodicidad y alcalinidad fuerte, presencia de mantos acuíferos superficiales o cerca de drenes azolvados, entre otros. La parcela fue diseñada en dos secciones, una de 4 ha donde se aplicaron los biosólidos y otra de 1 ha sin aplicación a utilizarse como testigo o control de comparación, la cual incluyó fertilizante conforme la dosis que utiliza el agricultor (Figura 2). El manejo del cultivo fue con las prácticas de campo que hace el agricultor tradicionalmente en ambas secciones.

MUESTREO Y ANÁLISIS DE BIOSÓLIDOS, AGUA DE RIEGO Y SUELO

Biosólidos

El muestreo de lodos residuales o biosólidos consistió en coleccionar dos muestras compuestas de 2 kg (obtenidas de 10 submuestras) en las bandas que descargan los lodos a los camiones dentro de la planta de la PTAR Sur. También, durante las aplicaciones en campo se coleccionaron dos muestras compuestas obtenidas de las pilas de biosólidos descargadas en la esquina de cada parcela. Estas muestras se coleccionaron en bolsas Ziploc dobles y se transportaron en recipientes con hielo al laboratorio de ICB-UACJ.

Una porción de 200 g de cada muestra se secó en estufa a 65 °C hasta peso constante y el resto se dejó en fresco refrigerado a 4 °C para formar una pasta de saturación y obtener el extracto líquido para análisis de salinidad, alcalinidad y nitrógeno inorgánico. Una vez obtenida la muestra seca de biosólidos, esta se molió en mortero de porcelana y se tamizó con criba de plástico para evitar contaminación por metales pesados, además, el porcentaje de humedad y la concentración de nitrógeno total Kjeldahl (NTK) fue utilizado para el cálculo de la dosis de aplicación de biosólidos en campo. La determinación de NTK en los biosólidos fue mediante el método reportado por Aguilar *et al.* (1987).

Agua de riego

El muestreo de agua de riego consistió en la colecta de dos litros de agua en recipientes de plástico limpios, los cuales fueron etiquetados para cada parcela y fecha del riego. Esta actividad se realizó en coordinación con los agricultores, ya que los riegos en ciertas condiciones dependen de la disponibilidad de agua del canal principal o de los pozos particulares. El número de muestras de agua varió de tres a cuatro conforme los riegos en cada parcela. Las muestras de agua fueron transportadas en hieleras al laboratorio y refrigeradas a 4 °C para su análisis químico. Las variables analizadas fueron alcalinidad, salinidad y nitrógeno inorgánico.

Suelo

El muestreo del suelo se realizó antes de aplicar los biosólidos en cada parcela para determinar la textura y el contenido de nitrógeno y fósforo para el cálculo de la dosis agronómica de aplicación de biosólidos, además otro muestreo fue en la etapa de cosecha del cultivo y así realizar las comparaciones de parámetros físicos y químicos del suelo.

El muestreo consistió en coleccionar tres muestras compuestas de suelo tanto en el área testigo (control) como en el área con biosólidos en la parcela de evaluación a profundidades de 0 a 30 cm y 30 a 60 cm, el número de submuestras fue de cinco para formar una muestra compuesta (Figura 3). Las muestras se coleccionaron con barrena de acero inoxidable para evitar contaminación por metales pesados, se colocaron en bolsas de plástico limpias y debidamente etiquetadas, se transportaron al laboratorio, se secaron a la sombra, se molieron y tamizaron a 2 mm de diámetro y se almacenaron para su análisis físico y químico.

El análisis de alcalinidad en suelo fue mediante la medición del pH con el método de relación 1:2, el cual consistió en pesar 10 g de suelo y se añadió 20 ml de agua, se agitaron durante tres minutos y se dejaron reposar 10 minutos repitiendo este último paso tres veces, posteriormente se midió el pH con el potenciómetro marca Pinchale 530 debidamente calibrado con soluciones estándar a pH de 4, 7 y 10. El análisis de salinidad consistió en añadir 30 ml de agua a las mismas muestras donde se midió el pH, se dejaron reposar por 24 h y se les midió la conductividad eléctrica (método 1:5), utilizando un conductímetro Orión 3 Star previamente calibrado con una solución estándar de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Semarnat, NOM-021-RECNAT-2000; Aguilar *et al.*, 1987).

Otro método utilizado fue mediante pastas de saturación de suelo al pesar 250 g de cada muestra, se añadió agua destilada hasta quedar saturado sin exceso de agua, se dejó reposar 24 h, se obtuvo el extracto con bomba de vacío para el análisis de alcalinidad y salinidad. El análisis de N inorgánico consistió en pesar 5 g de la muestra de suelo, posteriormente se colocaron en matraces de polietileno y se les agregó 50 ml de KCl 2N como extractante, después se agitaron durante una hora y se filtraron. La medición fue con el autoanalizador AA3-Seal Analytical (www.seal-analytical.com).

El Nitrógeno total Kjeldahl consistió en pesar 1 g de cada muestra de suelo y se colocaron en tubos Kjeldahl, se les añadió 6 ml de ácido sulfúrico concentrado, una pastilla para digestión Kjeldahl, se colocaron en el digestor a 375 °C durante tres h, luego el digestado se colocó en el destilador por arrastre de vapor, se agregó hidróxido de sodio 10 N, se coleccionó el destilado en ácido bórico y se tituló la solución resultante con ácido sulfúrico 0.05 N. El análisis de fósforo Olsen consistió en pesar 2.5 g de suelo, se colocaron en matraces de polietileno y se les agregó 50 ml de NaCOH3 0.05 M como extractante, después se agitaron por una hora y se filtraron.

La concentración de fósforo en el extracto fue determinada con el método del ácido ascórbico y lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 882 nm (Aguilar *et al.*, 1987). La dosis de aplicación de biosólidos o tasa agronómica para cada suelo fue calculada con base en la humedad de los biosólidos, el requerimiento de nitrógeno del cultivo, el nitrógeno residual del suelo y una

tasa de descomposición promedio del material orgánico conforme experimentos previos en suelos de la región.

La maquinaria utilizada fue una retroexcavadora y la esparcidora de biosólidos marca Knight 8030 Pro Twin Slinger facilitada por la JMAS. Este equipo fue inspeccionado y calibrado para estimar la cantidad de biosólidos a aplicar en un área específica de terreno (Figura 4). El traslado de los biosólidos de la PTAR Sur a las parcelas fue en camiones con tolvas de 6 m³, los cuales están sellados y fueron vigilados para evitar derrames del material durante el traslado y así evitar atracción de vectores y posibles riesgos a las personas y animales domésticos. Se utilizó un trascabo para cargar la tolva de la esparcidora y un tractor agrícola John Deere 4440 para la aplicación; la esparcidora a nivel 6 de descarga y toma de fuerza del tractor a 1000 rpm. Inmediatamente después de la aplicación de biosólidos se dio un rastreo para incorporar los biosólidos y evitar la atracción de vectores como roedores.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para detectar diferencias significativas entre los tratamientos biosólidos y control, a los datos obtenidos tanto de las etapas fenológicas del algodón como de las concentraciones de nutrientes fósforo y nitrógeno, se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de promedios Tukey mediante el programa SPSS versión 21.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta del cultivo en producción de algodón se muestra en el Cuadro 1. Ambas variables no fueron estadísticamente diferentes ($P > 0.05$) entre el suelo tratado con biosólidos y el que recibió fertilizante químico (sulfato de amonio). La diferencia a favor del suelo con biosólidos fue de 489 kg/ha de algodón en hueso y 153 kg/ha de fibra.

Otra de las respuestas fue la calidad de la fibra, medida en un equipo computarizado, (HVI) instrumento de alta velocidad (por sus siglas en inglés). En el Cuadro 2 se indican los promedios de longitud, uniformidad, resistencia y finura de la fibra de algodón. Se observa que para longitud de fibra, las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.01$) y para finura solo significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos aplicados, pero la uniformidad de fibra y la resistencia no se afectaron significativamente por los tratamientos. Con

el fertilizante químico (sulfato de amonio) se incrementó la longitud y la finura, lo que indica que existe un efecto favorable para la longitud que alcanzó los 31.68mm; en cambio con los biosólidos fueron 30.92 mm, aunque de acuerdo con las normas internacionales las dos medidas se clasifican como fibras largas, por lo tanto no existe un diferencial en el precio del algodón por esta característica. Sin embargo, la lectura del HVI para el sulfato fue de 5.05 índices de micronaire, se considera una fibra gruesa y puede tener un castigo al comercializarse, a diferencia del fertilizante orgánico, el índice de micronaire de 4.93 se considera fibras medias y no se les castiga el precio por esa característica. Según la norma de clasificación de algodón (Secretaría de Economía, 2000: NMX-A-051-SCFI-2000), la uniformidad de las fibras se considera muy alta por presentar porcentajes del 85.79 y 85.74 para los lodos y el sulfato. Esta característica es tan similar que solo hay una diferencia de 0.05%, por lo tanto, no permite detectar diferencias estadísticas.

Para resistencia sucedió lo mismo que con uniformidad, los promedios empatados: 29.21gramos/tex para los biosólidos y 29.11 gramos/tex para el fertilizante inorgánico. La clasificación de ambas es muy resistente, considerada como ideal para la fabricación de prendas de vestir. El efecto de los tratamientos en el desarrollo del algodonero también fue registrado mediante el número de plantas en 10 m de longitud, a los 24 días se tuvieron 105 y 100 plantas en promedio para biosólidos y el fertilizante químico, respectivamente. En la segunda medición se redujo el número de plantas porque al realizar una de las escardas, el suelo que cubrió algunas plantas y no se recuperaron, los resultados para ambos tratamientos fueron 95 y 93 plantas. A los 194 días después de siembra (dds) que fue el final del ciclo agrícola se contabilizaron 86 plantas para el lote con biosólidos y 87 plantas para el fertilizante. Estos promedios no fueron diferentes significativamente ($P > 0.05$), lo cual confirma que los biosólidos no afectan el establecimiento del cultivo y la densidad de plantas. Los promedios de altura de planta para los tratamientos evaluados a los 51, 103, 117, 145 y 194 dds, en ninguna de las etapas evaluadas de detectaron diferencias estadísticas para los tratamientos aplicados, lo cual apoya la hipótesis de que la respuesta del algodonero sería igual cuando se usan los biosólidos que fertilizantes inorgá-

Calidad de Fibra HVI								
Muestra	Longitud (mm)		Uniformidad (%)		Resistencia (gramos/tex)		Finura (i.m.)	
	Biosolido	Sulfato	Biosolido	Sulfato	Biosolido	Sulfato	Biosolido	Sulfato
1	31.17	32.00	85.20	85.30	29.60	28.60	4.74	4.72
2	32.39	31.37	85.50	87.00	30.20	28.60	4.81	5.15
3	30.40	32.51	85.60	85.90	26.80	28.50	5.18	5.09
4	31.52	31.75	87.20	83.80	28.60	28.60	5.08	5.07
5	30.81	31.88	86.10	83.60	30.00	28.20	4.87	5.15
6	30.76	31.80	85.60	84.90	29.50	27.50	5.01	5.01
7	31.57	31.60	85.00	84.00	28.30	28.60	4.91	4.98
8	30.86	32.28	87.00	86.50	30.00	32.50	4.89	5.14
9	30.84	32.05	86.70	86.30	29.50	32.10	5.00	5.03
10	30.45	30.99	85.10	84.80	27.60	29.80	4.90	5.02
11	30.07	31.22	85.60	87.30	28.60	28.30	5.04	5.11
12	30.30	31.62	85.90	86.80	29.90	30.30	4.84	4.86
13	31.47	31.06	84.40	86.90	30.30	27.60	4.97	5.13
14	30.30	31.39	86.10	87.20	30.00	28.40	4.77	5.17
Media	30.92	31.68	85.79	85.74	29.21	29.11	4.93	5.05
Desv. Est	0.64	0.45	0.79	1.32	1.07	1.53	0.12	0.13
Valor prob	0.001		0.904		0.854		0.022	
Significancia	**		n.s.		n.s.		*	

Cuadro 2. Calidad de fibra: longitud, uniformidad, resistencia y finura usando biosólidos y sulfato de amonio como fuentes de fertilización en algodónero durante 2014 en el Valle de Juárez, Chihuahua.

nicos como el sulfato de amonio. Los promedios alcanzados con biosólidos fueron de 13.86, 91.24, 105.8, 100.6 y 98.33 cm de altura de planta para los días indicados, respectivamente. Para el sulfato de amonio en esos mismos días la alturas de planta fueron de 14.02, 90.62, 102.50, 101.3 y 101.19 cm.

Rendimiento de Algodón en hueso y fibra (kg/ha)				
Muestra	Rend. en hueso		Rend. de fibra	
	Biosólidos	Sulfato	Biosólidos	Sulfato
1	4908	7603	1988	2996
2	6063	8373	2534	3332
3	8058	7095	3255	2824
4	5844	8609	2355	3908
5	7087	5661	2884	2242
6	6247	6019	2580	2468
7	7892	6142	3007	2813
8	6920	6509	2851	2571
9	8023	7708	3289	3122
10	7909	5153	3132	2360
11	7200	5687	2988	2235
12	5888	3990	2408	1843
13	8049	5433	3381	2211
14	7826	7095	3169	2753
Media	6994	6505	2844	2691
Desviación Estándar	1038	1310	413	536
Valor probabilístico	0.284		0.405	
Significancia	n.s.		n.s.	

Cuadro 1. Rendimiento de algodón en hueso y de fibra con la aplicación de biosólidos como fertilizante orgánico y sulfato de amonio como inorgánico, 2014.

La formación de frutos o bellotas no se afectó en las dos primeras muestras que se tomaron a los 103 y 117 dds, estadísticamente fueron iguales las respuestas para los dos tratamientos, con promedios de 5.9 y 6.2 bellotas por planta, para biosólidos y sulfato, respectivamente. Los valores promedios del número de bellotas fueron 10 y 12 frutos para cada tratamiento. Sin embargo, a los 145 dds las diferencias fueron significativas en términos estadísticos ($P < 0.05$) a favor de los biosólidos con un promedio de 22 bellotas por planta, en tanto el sulfato contaba con 19.64 bellotas. Al momento de la cosecha las diferencias fueron altamente significativas, a favor del fertilizante inorgánico con 5.19 bellotas por planta, superando en más del 100% a los biosólidos; esta no es una característica deseable al momento de la cosecha, ya que representa un alto porcentaje de frutos que no se pueden cosechar, obligando a un segundo paso de maquinaria para recolectar capullos, elevando los costos de producción. Estos resultados coinciden con investigaciones en la región para biosólidos estabilizados con cal (Figueroa *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2010 y Flores y Méndez, 2013), así como los estudios de largo plazo reportados por Cogger *et al.*, (2001).

Con respecto al total de frutos y el porcentaje de precocidad, los promedios de capullos cosechados en el lote con biosólidos fue 12.81 y los del sulfato de amonio fue 13.86, al compararlos con la prueba de *t* resultaron estadísticamente iguales, por lo tanto no hay un efecto de los tratamientos en la expresión de esta variable. En cambio para total de frutos las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.01$) con una ventaja del fertilizante inorgánico 19.05 frutos, sobre los biosólidos con 15.26 frutos. En el porcentaje de precocidad fue mayor con los biosólidos con 84.98%, a pesar de que logro menos frutos que el testigo. Este alto porcentaje es muy favorable para el productor de algodón porque en una cosecha se obtiene casi el total de la producción, lo cual coincide con los hallazgos de Figueroa *et al.*, (2008) en suelos similares.

El índice relativo de clorofila fue registrado como indicador de la intensidad del color verde de las hojas y absorción de nitrógeno por las plantas de algodónero, a los 145 dds se registró este índice en los dos tratamientos. Se utilizó el equipo de medición de clorofila CM 1000; los promedios de índice fueron 498.93 para el lote con biosólidos y de 491.93 para el sulfato de amonio, los cuales no reflejaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$), es decir los dos

tratamientos produjeron efecto similar en la cantidad de clorofila de las plantas.

El rendimiento de la planta de algodón está integrado por el peso de los capullos, el índice de semilla y el porcentaje de fibra. Se encontró que el promedio de peso de capullos e índice de semilla las diferencias fueron significativas en términos estadísticos ($P < 0.05$), los promedios más altos se presentaron con el fertilizante inorgánico, lo que demuestra que estas dos variables son afectadas de manera positiva por el fertilizante. El promedio de peso de capullo fue de 5.82 g y 10.33 g de índice de semilla, en cambio para biosólidos los pesos respectivos fueron de 5.63 g y 9.87 g. Los porcentajes de fibra promedio de 40.70% y 41.54% no fueron diferentes significativamente ($P < 0.05$).

ANÁLISIS ECONÓMICO DE LA PRODUCCIÓN DE ALGODÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE BIOSÓLIDOS

Para realizar este análisis se consideró la producción comercial de las dos parcelas. La cosecha se realizó mecánicamente el 25 de noviembre de 2014 y antes de ser despepitados los capullos se determinó la producción de algodón en hueso de cada tratamiento. En la Figura 5 se observan los rendimientos comerciales de 6127 kg/ha para el fertilizante inorgánico (control) y 6071 kg/ha para los biosólidos. La diferencia de 56 kg de algodón a favor del fertilizante, indica que prácticamente se logra el mismo rendimiento. Sin embargo la diferencia real se considera en los costos de producción de ambos tratamientos. Dado que el manejo del cultivo fue similar los costos que se consideran para el análisis económico son los del Cuadro 3. El costo de aplicación y el rastreo para incorporar los biosólidos en el suelo fue \$1000 pesos; el costo del fertilizante y las dos aplicaciones de este fue \$4260 pesos, lo que resulta en un ahorro de \$3260 pesos cuando se aplican los biosólidos. Por otro lado, si se consideran los precios de venta de 11.749 pesos por kilogramo de algodón (SIAP 2014), los 56 kg de diferencia a favor del sulfato de amonio dan una utilidad de \$657.94 pesos. Por esto la ganancia o el ahorro por el uso de biosólidos fue de \$2602.06 pesos por hectárea. Obteniéndose de manera adicional algunas ventajas con el uso de estos lodos en terrenos agrícolas.

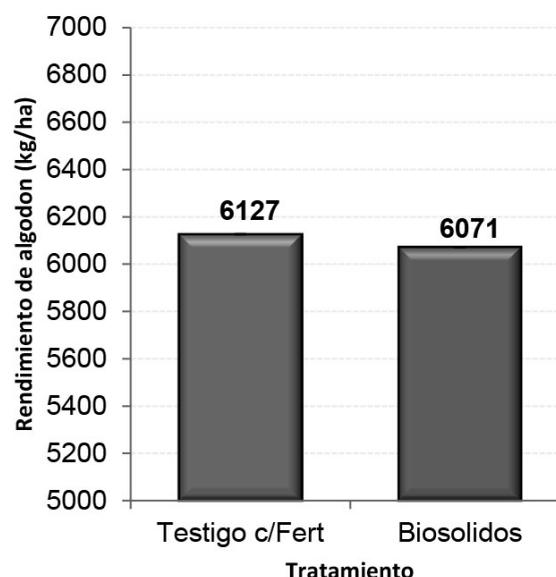


Figura 5. Rendimiento comercial de algodón en hueso para los tratamientos de biosólidos y control (fertilizante inorgánico) en el Valle de Juárez, Chihuahua.

Actividad	Biosólidos	Sulfato de amonio
Aplicación	500	0
Rastreo	500	0
Fertilizante 800 kg	0	3260
Aplicaciones (dos)	0	1000
Total	1000	4260
Producción de algodón (kg/ha)	6071	6127
Venta de algodón (\$11.746/kg)	71328.18	71986.12
Ahorro o ganancia / ha	2602.06	0

Cuadro 3. Análisis económico en el experimento de biosólidos y sulfato de amonio como fuentes de fertilización durante 2014 en el Valle de Juárez, Chihuahua.

EFFECTO DE LOS BIOSÓLIDOS EN LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

La textura es una propiedad física del suelo que con el rango de dosis agronómica de biosólidos utilizadas en este proyecto no causan cambios en los porcentajes de limo, arena o arcilla en un ciclo agrícola. Sin embargo a varios ciclos de aplicación de biosólidos si debería monitorearse el análisis granulométrico del suelo. Los biosólidos en suelos arenosos mejoran la retención de agua y la fertilidad del suelo por la aportación de materia orgánica, mientras que en suelos arcillosos mejoran la labranza y la fertilidad (Cogger *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2010). El Cuadro 4 muestra que la textura del suelo fue predominantemente franco arcilloso a las profundidades de 0 a 30 y 30 a 60 cm.

Clase Textural	Limo (%)	Arcilla (%)	Arena (%)	Peso de suelo (g)	Descripción
Franco-Arcilloso	27.00	37.24	35.76	50	UACJ-sur-Este 0-30 cm
Franco-Arcilloso	33.00	32.24	34.76	50	UACJ-sur-Este 30-60 cm
Franco-Arcilloso	41.00	29.24	29.76	50	UACJ-medio-Este 0-30 cm
Franco-Arcilloso	32.00	30.24	37.76	50	UACJ-medio-Este 30-60 cm
Arcilloso	28.00	41.24	30.76	50	UACJ-norte-Este 0-30 cm
Franco-Arcilloso	40.00	31.24	28.76	50	UACJ-Este-W 30-60 cm

Cuadro 4. Análisis de textura de suelo del rancho Universitario UACJ en Praxedis G Gro., Chihuahua.

El análisis de conductividad eléctrica (C.E.)

que permite determinar la salinidad del suelo de los tratamientos evaluados. El suelo en la parcela del Rancho Universitario UACJ presentó una C.E. mayor que 4.0 dS/m en el control (tratamiento con fertilizante químico) y es clasificado como salino, mientras que en el suelo tratado con biosólidos la C.E. disminuyó de 4.0 dS/m en ambas profundidades. En esta parte del estudio se incluyó el análisis de suelo de otro lote donde se aplicó biosólidos con fines de comparación con texturas diferentes. Esta fue la parcela del ejido San Isidro también cultivada con algodón, en este caso también la salinidad disminuyó en el perfil 30 a 60 cm en el tratamiento con biosólidos, mientras que en la profundidad 0 a 30 cm no se observó efecto en esta variable (Figura 6). También se observa que la salinidad fue mayor en la profundidad 30 a 60 cm en el control de ambos sitios. El análisis de varianza realizado para detectar diferencias significativas en la C.E. del suelo entre sitios, entre tratamientos de cada sitio y entre profundidades de cada tratamiento, indicó que si hay diferencia significativa entre sitios ($p < 0.1$) con un valor de $Pr > F$ de 0.0602, pero entre tratamientos y profundidades no se encontraron diferencias significativas con valores de $Pr > F$ de 0.1789 y 0.4662, respectivamente.

El pH del suelo en promedio no vario significativamente y se observó entre 7.8 y 8.4 para las dos parcelas y las dos profundidades (Figura 7). Entre sitios se observó diferencias significativas para el pH del suelo ($p < 0.1$) con un valor de $Pr > F = 0.056$, pero entre tratamientos y profundidades no existen diferencias significativas teniendo un valor de $Pr > F$ de 0.2564 y 0.6282, respectivamente.

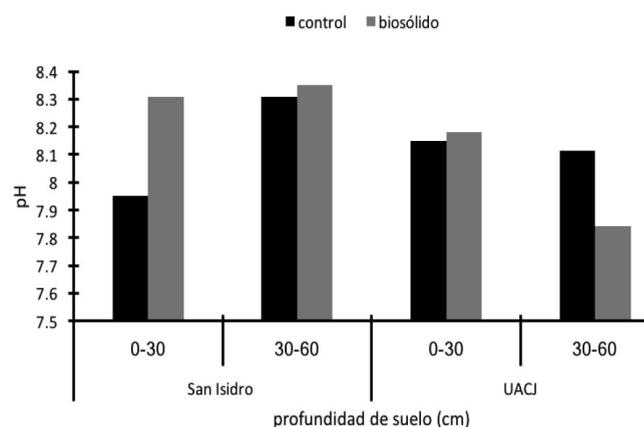


Figura 6. Promedios de conductividad eléctrica del suelo para los distintos sitios, profundidades y tratamientos evaluados.

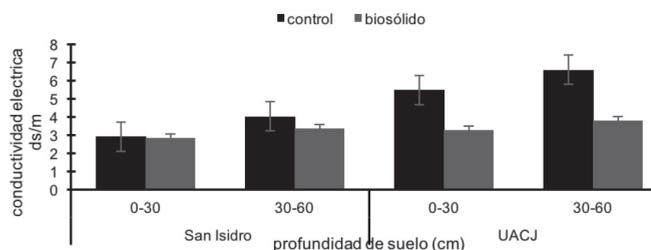


Figura 7. Promedios de pH del suelo para cada uno de los sitios, tratamientos y profundidades.

El análisis del contenido de N inorgánico del suelo realizado para la parcela del rancho universitario muestra una diferencia que favorece al tratamiento control (fertilizante) en los meses de agosto y septiembre, sin embargo al final el biosólidos apporto una mayor concentración de N-NO₃ en la profundidad de 0 a 30 cm con una suma de 72 mk/kg (Cuadro 5). Para la profundidad de 30-60 cm solo se realizaron mediciones al inicio y al final del experimento dando como resultado que el control tuvo ligeramente mayor concentración de N inorgánico (Cuadro 6).

Fecha	Control	Biosólidos
Marzo 2014	6.10	6.10
Julio 2014	36.51	27.90
Agosto 2014	20.45	26.53
Septiembre 2014	12.81	4.83
Enero 2015	4.37	8.25

Cuadro 5. Promedios de las concentraciones de N-NO₃ (mg/Kg) del suelo por cada mes en la profundidad de 0 a 30 cm en el rancho universitario, Praxedis.

Fecha	Control	Biosólidos
Marzo 2014	2.19	2.19
Enero 2015	2.76	2.55

Cuadro 6. Promedios de concentración de N-NO₃ (mg/kg) a diferentes fechas en el Rancho Universitario UACJ a una profundidad de 30-60 cm.

Los promedios de N inorgánico entre los sitios, los tratamientos de cada sitio y las profundidades de cada tratamiento en los diferentes sitios se muestran en la Figura 8. El análisis de varianza indico diferencias significativas de concentraciones de nitratos entre los sitios, entre los tratamientos de cada sitio y entre las profundidades de cada tratamiento. El resultado fue que entre sitios no existen diferencias significativas con un valor de Pr>F de 0.8847, entre tratamientos tampoco existen diferencias con un valor de Pr>F de 0.0658, sin embargo entre profundidades de suelo si existen diferencias significativas (p<0.05) con un valor de Pr>F =0.0213, es decir este valor P resultado menor que un nivel de significancia de 0.05.

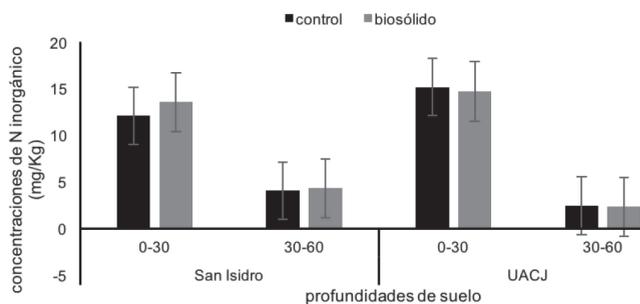


Figura 8. Comparación de las concentraciones de N inorgánico del suelo de los dos sitios, de los diferentes tratamientos y entre las profundidades.

El análisis de las concentraciones de fósforo del Rancho Universitario para distintos meses muestra una curva descendente para el tratamiento control (fertilizante) y una ascendente para el tratamiento con biosólidos (Figura 9) para la profundidad de 0-30 cm. Para la profundidad de 30-60 cm se muestran los resultados en la Cuadro 7. En total, se muestran en la Figura 10 las concentraciones de P inorgánico promedio para los dos sitios, los distintos tratamientos y las distintas profundidades de suelo.

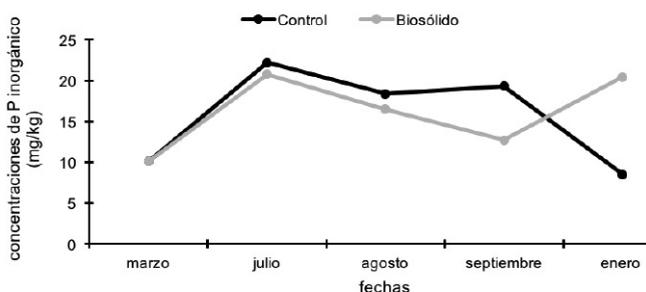


Figura 9. Concentraciones de P inorgánico para los dos tratamientos en el Rancho Universitario a una profundidad de 0-30 cm.

Fecha	Control	Biosólidos
Marzo 2014	13.69	13.69
Enero 2015	77.734	5.15

Cuadro 7. Medias de las concentraciones de fósforo (mg/Kg) inorgánico para el rancho universitario en una profundidad de 30-60 cm.

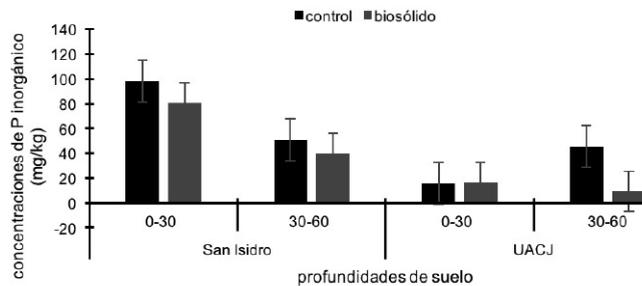


Figura 10. Concentraciones promedio de P inorgánico de cada sitio, tratamiento y profundidad.

Se realizó un análisis de varianza para detectar si existen diferencias significativas entre sitios, entre tratamientos de cada sitio y entre las profundidades de cada tratamiento para la concentración de fósforo. Se encontró que existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre sitios y entre profundidades de cada tratamiento con valores de $Pr > F$ de 0.0001 y 0.0309, respectivamente, y no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos con un valor $Pr > F$ de 0.4784. En el caso de la parcela del Rancho Universitario en promedio el tratamiento de biosólidos aportó más nitrógeno total que el tratamiento control para la profundidad de 0-30 cm y en la profundidad de 30-60 cm no hubo diferencias significativas (Figura 11). El análisis de varianza sobre las concentraciones de NTK entre sitios, tratamientos y profundidades, resultó en que solo hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las profundidades de cada tratamiento con un valor de $Pr > F$ de 0.0362. El valor $Pr > F$ para sitios y tratamientos respectivamente fue de 0.2456 y 0.6768, respectivamente.

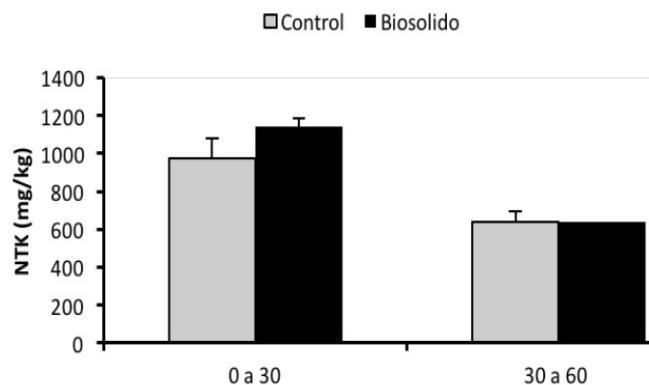


Figura 11. Promedios de las concentraciones de nitrógeno total en mg/kg para los tratamientos en dos profundidades de suelo.

CONCLUSIONES

La producción de algodón no fue estadísticamente diferente entre el suelo tratado con biosólidos y el control con fertilizante químico. La calidad de fibra en los parámetros de longitud y finura se incrementó con el fertilizante sulfato de amonio. El índice relativo de clorofila, el número de plantas y su altura no varió significativamente entre ambos tratamientos. La formación de frutos o bellotas no se afectó, así como el total de frutos, pero el porcentaje de precocidad fue mayor en el suelo con biosólidos. El análisis económico reflejó un ahorro de 3260 pesos en el costo de producción de algodón cuando se aplican los biosólidos. Las propiedades físicas del suelo no se modificaron significativamente con la aplicación en dosis agronómica de biosólidos, pero sí en nutrientes como el contenido de fósforo y nitrógeno total.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por: Environmental Protection Agency (US-EPA) dentro del Programa Frontera 2020 Región 6, los recursos económicos fueron administrados por la Comisión de Cooperación Ecológica Fronteriza (COCEF) y asignados a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ) a través del convenio Institucional COCEF – UACJ No. TAA 14-028, PID: 20247, B2020, R6.934.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, A., Etchevers, J.D., y Castellanos, J.Z. 1987. *Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo*. 1 era edición. Sociedad mexicana de la ciencia del suelo. México, D.F. 215 p.
- CAR-Degremont. 2016. *Estadísticas de agua residual tratada y biosólidos generados en Ciudad Juárez, Chihuahua*.
- COCEF, 2016. Comisión de Cooperación Económica Fronteriza. <http://www.cocef.org/>. Consultado el 1 de Septiembre de 2016.
- Cogger, C., G. A.I. Baray, S.C. Fransen, and D.M. Sullivan. 2001. Seven years of biosolids versus inorganic nitrogen applications to tall fescue. *J. Environ. Qual.*, 30:2188-2194.
- Figuroa, V.U., M.A. Flores O., M. Palomo R., B. Corral D. y J.P. Flores M. 2008. Uso de biosólidos estabilizados con cal como fertilizante orgánico en algodón para el Valle de Juárez, Chihuahua. *Ciencia en la Frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ*. VIII(2):35-43.
- Flores, M.J.P., M.K. Shukla, and S. Deb. 2014. Mapping of airborne particulate matter collected using two sensors along US-Mexico border. *J. of Environ. Anal. Toxicol.*, 4:2 <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.1000206>.
- Flores, M.J.P. y H. Méndez O. 2013. *Evaluación de Biosólidos en una Predio Agrícola del Valle de Juárez, Chihuahua*. Informe final de proyecto. SAPN, Servicios Agropecuarios Paso del Norte S.C. Concesionaria de Aguas Residuales de Ciudad Juárez – Degremont, Junta Municipal de Agua y Saneamiento de Ciudad Juárez, 38 p.
- Flores, M.J.P., B. Corral D. y G.S. Mediano. 2007. Mineralización de nitrógeno de biosólidos estabilizados con cal en suelos agrícolas. *Terra Latinoamericana*. 25:409-417.
- Flores, M.J.P., M.Z. Poncio A., E. Salas G., F. Pérez C., A.Y. Corral A. y H.I. Trejo E. 2010. Mineralización de nitrógeno de biosólidos estabilizados con cal. *Terra Latinoamericana*. 28:307-317.
- Flores, M.J.P., E. Jaramillo L., N.W. Assadian, G. Di Giovanni, F. Perez C. and M. K. Shukla. 2013. Heavy metals in oat and soil treated with lime-stabilized biosolids and reclaimed wastewater. *J. of Environ. Anal. Toxicol.*, S6.<http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.S6-001>.
- Flores, M. J. P., Valero Córdoba, C., Osuna Ávila, P., Corral Díaz, B., y Shukla, M. 2013. Textura del suelo y tipo de agua de riego en la disponibilidad de fósforo. *Terra Latinoamericana*, 11:220.
- Secretaría de Economía. 2000. Norma mexicana, NMX-A-051-SCFI-2000 Productos agrícolas no industrializados para uso industrial - algodón para hilar –(*Gossypium spp*)– especificaciones. 15 p. consultada el 30 de Junio de 2015. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Lists/Instrumentos%20Tcnicos%20Normalizacin%20y%20Marcas%20Colecti/Attachments/70/NMX_ALGODON%20PARA%20HILAR.pdf.
- SEMARNAT, NOM-004-ECOL-2002. Norma oficial mexicana, protección ambiental. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. Secretaría de medio Ambiente y Recursos Naturales-SEMARNAT. 18 p.
- SEMARNAT, NOM-021-RECNAT-2000. Norma oficial mexicana, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis protección ambiental. 75 p.
- SIAP, 2014. Estadísticas agropecuarias en México.

SAGARPA. <http://www.gob.mx/siap/>. Consultado el 5 de septiembre de 2016.

U.S.EPA, 1994. Land application of sewage sludge. Guide Part 503 biosolids rule. EPA/831-B-93-002b. 105 p.

http://water.epa.gov/polwaste/wastewater/treatment/biosolids/upload/2002_06_28_mtb_biosolids_sludge.pdf. Consultado el 17 de Febrero de 2014.

Preparación de un injerto traqueal a partir de una matriz biológica de cerdo

Elisa Barrera Ramírez^{1}*
Rubén E. Garrido Cardona^{1,2,3}
Edna Rico Escobar^{1,3}
Alejandro Martínez Martínez⁴
Luis Fernando Plenge Tellechea⁴
Alfredo Hernández⁶
Enrique Vanegas Venegas¹
Rubén Rincón¹

RESUMEN

La ingeniería tisular con la regeneración de órganos busca sustituir funciones biológicas al utilizar matrices y células autólogas, el objetivo del proyecto es obtener un injerto traqueal. Se utilizaron dos métodos para descellularizar tráqueas, obtenidas de cerdos sacrificados con otro propósito, las matrices se esterilizaron y almacenaron a -80°C hasta el proceso de regeneración. Se descongelaron y se implantaron en el epiplón de la cavidad abdominal de tres cerdos Yorkshire recibiendo diferente matriz. Después de 15 y 8 días se obtuvo el tejido para su evaluación. Las matrices mostraron diferentes características macroscópicas en relación al control, a la evaluación mecánica no hubo diferencias significativas. En la evaluación histológica las matrices no presentaron epitelio y glándulas, en ambas se encontraron condrocitos residuales en el cartílago. En la tráquea nativa criopreservada se encontró epitelio y la arquitectura y condrocitos estaban íntegros. Los tejidos regenerados presentaron revascularización, neoformación y alteraciones mecánicas. Todos los animales sobrevivieron al experimento. Se obtuvo un injerto utilizando una matriz biológica regenerando el tejido en el epiplón abdominal, como una opción sencilla, factible y económica. Las alteraciones mecánicas del injerto se deben probablemente al tratamiento drástico en la descellularización, criopreservación o a la falta de fuerzas de cizallamiento.

Palabras clave: Matrices biológicas, ingeniería tisular, injerto, tráquea

- 1 Médico Especialista en Inmunología, Profesor Investigador, Coordinación de Medicina, Departamento de Ciencias de la Salud, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- 2 Cirujano de Tórax, Servicio Cirugía Torácica, Centro Médico de Especialidades de Ciudad Juárez.
- 3 Colegio de Chihuahua.
- 4 Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez,
- 5 Servicio de Patología, Centro Médico de Especialidades de Ciudad Juárez.
- 6 Unidad de Cirugía Experimental, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Correo: ebarrera@uacj.mx tel. (656) 1995294; Insurgentes 2575 Ciudad Juárez, Chihuahua.

INTRODUCCION

Se han realizado múltiples intentos para obtener injertos traqueales adecuados para trasplante, la dificultad en la disponibilidad del órgano ha llevado a probar otros tratamientos,^{1,2,3} como la generación de órganos funcionales por bioingeniería.^{4,5,6,7} El objetivo de este proyecto es desarrollar los métodos para obtener matrices biológicas traqueales, para su posterior regeneración y utilización como injertos en cerdos.⁸ Consiste en obtener tejido traqueal de un donador, descelularizarlo y contar con una matriz soporte para las células del receptor y lograr su regeneración como la reepitelialización y revascularización del tejido para su implante.^{9,10} El injerto ideal de tráquea debe contar con las características mecánicas como rigidez, flexibilidad e integridad para que no colapse durante la inspiración,¹¹ no inmunogénico para evitar el rechazo, no tóxico, y debe contar con vasculatura y epitelio cilíndrico ciliado que lo hace resistente a la colonización bacteriana y garantiza su permanencia. Para ello se debe tener una matriz adecuada que funcione como soporte para las células del receptor que permita la adhesión celular, el crecimiento y la diferenciación.^{12,13,14} Pueden ser biológicas de un donador de la misma especie (alógenicas) de un donador de diferente especie, (xenogénicas), sintéticas o combinadas.^{15,16} Un factor importante en la regeneración del tejido es el biorreactor como dispositivo para contener la matriz, células y moléculas necesarias para permitir su interacción en las condiciones ideales para la regeneración del tejido.¹⁷ Este ambiente de cultivo debe ser dinámico, controlable y reproducible. Es esencial para la distribución de las células el suministro de nutrientes y eliminación de desechos apoyando la actividad metabólica y la diferenciación. También provee de fuerzas hidrodinámicas de tensión y cizallamiento para promover el desarrollo del tejido, la angiogénesis y la función ciliar, sin olvidar la esterilidad.^{18,19}

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El experimento se llevó a cabo bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado de los animales y con la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Para la obtención de las matrices biológicas, seis tráqueas

fueron sometidas a los métodos para la descelularización con tritón y desoxicolato y dos tráqueas se criopreservaron como nativas. Todas fueron esterilizadas y almacenadas a -80°C hasta el proceso de regeneración. Para ello se descongelaron dos matrices descelularizadas y una tráquea nativa, se tomó una muestra para su análisis y fueron implantadas en la cavidad abdominal rodeadas con epiplón de tres cerdos Yorkshire, para su regeneración. En cada animal se colocó diferente matriz una tráquea descelularizada con tritón, otra con desoxicolato y una tráquea nativa criopreservada, después de 15 y 8 días se obtuvo el tejido para su evaluación mecánica e histológica, una tráquea nativa se utilizó como control.

Obtención de matrices

Se obtuvieron 8 tráqueas de cerdos sacrificados con otros propósitos, se limpiaron retirando otros tejidos y se lavaron seis veces con tampón fosfato salino (PBS) y antibiótico (moxifloxacino, Avelox, Bayer Sol 400mg/250mL I.V lote BXG8Z21 oct 2015), en esta misma solución se almacenaron a 4°C hasta iniciar los procesos para la descelularización. 2 tráqueas se mantuvieron en criopreservación a -80°C hasta su utilización.¹³

Método descelularización con Tritón X-100

3 tráqueas se colocaron en una solución de hidróxido amónico con Tritón X-100 colocándolo en agitación durante 72 horas a 4°C para solubilizar los componentes citoplasmáticos y nucleares. A continuación, se lavaron las tráqueas 10 veces con agua destilada y se almacenaron cada una a 4°C en PBS, y moxifloxacino (Avelox, Bayer Sol 400mg/250mL I.V lote BXG8Z21 oct 2015) hasta su esterilización.²⁰

Método descelularización con desoxicolato de sodio

A un fragmento de 6 cm de tráquea se aplicaron 8 ciclos de la decelularización cada 48 horas por 4 horas, colocándola en un recipiente con desoxicolato sódico (sigma lot 61K0110) en NaCl al 0.9 % por 4 hrs en agitación a temperatura ambiente, después se tomó el tejido y se colocó en un recipiente con agua destilada, se agitó por 5 min, cambiando el agua destilada repitiendo el proceso 7 veces y se deja en PBS y antibiótico (moxifloxacino) en un recipiente plástico hermético a 4°C por 48 horas hasta el siguiente ciclo. Al finalizar el octavo se procedió a la esterilización.^{13,14}

Esterilización

Las tráqueas decelularizadas y las nativas criopreservadas se colocaron en bolsas estériles individuales, plásticas herméticas, utilizando una cámara de flujo en condiciones estériles, se rotularon y posteriormente se expusieron a rayos UV por 30 minutos después de lo cual se almacenaron a -80°C hasta su utilización.^{21,22}

Regeneración del tejido traqueal

Se utilizaron tres cerdos Yorkshire asignados al azar para recibir cada uno un implante diferente (Tabla 1).

Tráqueas	Animales	Sexo	Peso	Edad
Descelularizada Tritón	Cerdo Yorkshire	M	23.8 kg	4 meses
Descelularizada Desoxicolato	Cerdo Yorkshire	M	35 kg	5 meses
Nativa Criopreservada	Cerdo Yorkshire	H	31.2 kg	4 meses

Tabla 1 Animales de experimentación.

Cada cerdo recibió una matriz diferente, la tráquea decelularizada con tritón permaneció 15 días, y la decelularizada con desoxicolato y la nativa criopreservada 8 días.

Las matrices y la tráquea nativa criopreservada fueron descongeladas 12 horas a 4°C antes del procedimiento, se lavaron con solución fisiológica y se realizó la evaluación de las propiedades mecánicas. Se tomó una muestra para su análisis histológico antes de su implantación. Los animales fueron premedicados con ketamina (Anesket, PiSA), y Clorhidrato de xilacina (Rompun, Bayer) I.M y canalizados con solución Hartman (500 mL). Se anestesiaron con propofol (Recofol 200mg/20 mL PiSA), para iniciar la cirugía con asepsia y antisepsia, colocando campos, procediendo a realizar incisión abdominal hasta llegar a la cavidad abdominal exponiendo el epiplón donde se envolvieron las matrices y la tráquea nativa criopreservada fiján-

dolas con puntos en la pared, se continua cerrando la pared por planos. Todos los cerdos se recuperaron adecuadamente y recibieron antibiótico, moxifloxacin intramuscular (Avelox sol 400 mg amp 250 mL, Bayer lot BX68221 oct 2015) prednisona cada 12 hrs via oral (Meticorten tab 5 mg, Schering-Plough), y analgésico carprofeno 5% intramuscular cada 24 horas por dos días (Centrovet, 100 mL/5g, Ehlinger) y caprofen via oral cada 24 hrs (Carprobay 50 mg Bayer) hasta su siguiente procedimiento y fueron examinados diariamente, sin presentar ningún dato de inflamación o infección presentando buenas condiciones generales. La matriz decelularizada con tritón permaneció 15 días y la matriz decelularizada con desoxicolato y nativa criopreservada 8 días, posteriormente se procedió a realizar el mismo procedimiento quirúrgico para la obtención de los tejidos regenerados y realizar la evaluación mecánica e histológica. Todos los animales sobrevivieron al experimento y no mostraron datos de inflamación o infección.^{10,23}

ANÁLISIS MECÁNICO E HISTOLÓGICO

Se realizó la evaluación mecánica de las matrices, de la tráquea nativa criopreservada y de la tráquea nativa fresca como control así como de los tejidos regenerados. Los parámetros fueron rigidez, flexibilidad y recuperación de su forma original. Evaluando manualmente el porcentaje en la disminución de la luz traqueal al comprimirla sin forzarla, en una escala en donde el 0% refleja el lumen cerrado y el 100% totalmente abierto. La capacidad de flexión del tejido se determinó iniciando a partir de 180° hasta 10°. Después de la compresión se libera el tejido y se valora en porcentaje la recuperación de la conformación original, si es total es del 100%. Las características macroscópicas que se registraron fueron, la luz traqueal, la superficie externa, la presencia de necrosis, los vasos sanguíneos, remodelación, neoformación e integración del tejido sobre las matrices. Para el estudio histológico microscópico se tomaron muestras de cada tejido antes y después del proceso de regeneración, se fijaron en formalina y se embebieron en parafina para realizar los cortes y laminillas tiñendo con eosina y hematoxilina. El análisis se realizará en microscopio óptico evaluando la presencia de epitelio, condrocitos en cartílago, arquitectura, fibrosis, vasos sanguíneos, remodelación, e inflamación así como neoformación e integración de tejido a la matriz.²⁴

RESULTADOS

Matrices traqueales

El proceso de descelularización con tritón duró 72 horas y con desoxicolato 24 días (8 ciclos cada 48 horas por 4 horas) morfológicamente presentaron aspecto blanco translúcido y la nativa criopreservada un color rosado (Figura 1).

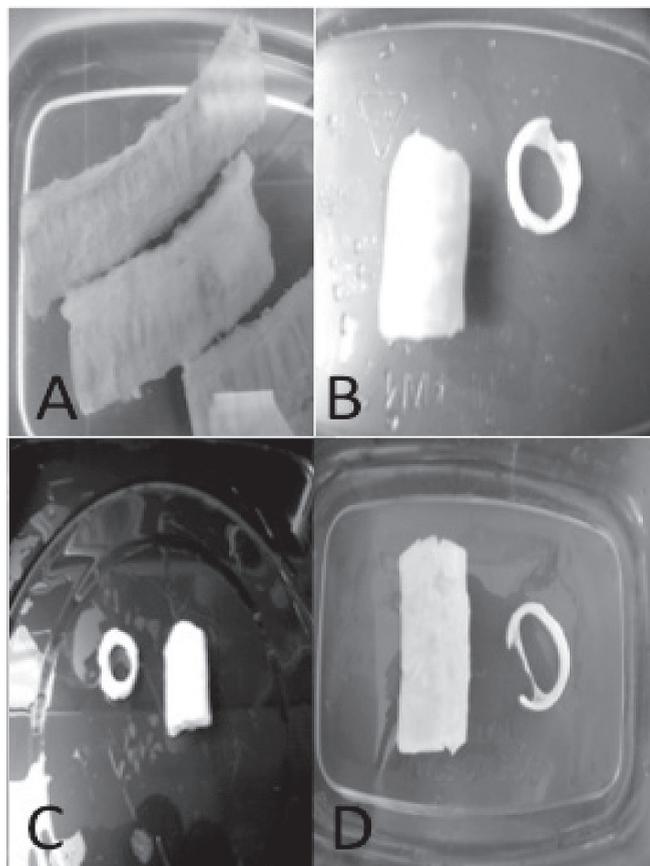


Figura 1. Características macroscópicas de las matrices traqueales (A) Tráquea nativa, (B) Matriz descelularizada con tritón (C) Matriz descelularizada con desoxicolato (D) Tráquea nativa criopreservada

Las matrices no mostraron diferencias significativas en la evaluación de las propiedades mecánicas, como en la capacidad de rigidez flexibilidad y configuración en comparación con la tráquea control (Tabla 2).

Tráquea	Rigidez (presión)	Flexibilidad (flexión)	Configuración (recuperación forma original)
Nativa	80%	140°	100%
Descelularizada Tritón	60%	120°	75%
Descelularizada Desoxicolato	70%	120°	80%
Nativa Criopreservada	75%	130°	100%

Tabla 2 Evaluación de las propiedades mecánicas de las matrices.

El termino nativa representa la tráquea natural no tratada y aporta los valores control. La rigidez disminuyó (>80%) o aumentó (<80%). La flexibilidad es mayor al disminuir el ángulo al flexionar la tráquea (>140°) y viceversa. Si el tejido recupera su configuración original totalmente después de la presión el valor es del 100%.

En la evaluación histológica las matrices no presentaron epitelio y glándulas. En ambas se encontraron condrocitos residuales en el cartílago. En la tráquea nativa criopreservada se encontró epitelio y la arquitectura y condrocitos estaban íntegros (Figura 2).

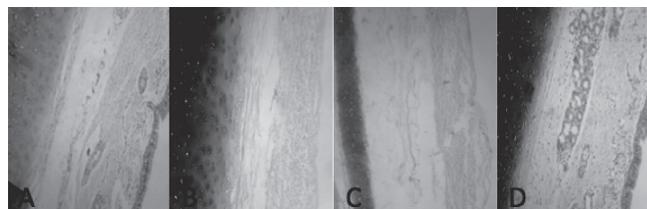


Figura 2. Evaluación histológica de las matrices. Cortes histológicos transversales de las matrices traqueales, (objetivo 10x) tinción con eosina y hematoxilina. (A) Tráquea nativa, arquitectura normal con epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado, (B) Matriz descelularizada con tritón, no hay presencia de epitelio no hay presencia de núcleos en la submucosa y muscular, cartílago conservado (C) Matriz descelularizada con desoxicolato, no hay presencia de epitelio ni células en submucosa y muscular, cartílago normal (D) Tráquea nativa criopreservada con presencia de epitelio, submucosa y cartílago sin alteraciones, solo se observa un ligero infiltrado inflamatorio.

EVALUACIÓN *IN VIVO*

Todos los animales que recibieron la implantación de las matrices y de la tráquea nativa criopreservada sobrevivieron al experimento y no mostraron datos de inflamación, infección o deterioro en su salud.

Evaluación morfológica y mecánica del tejido traqueal regenerado

Las matrices y la tráquea nativa criopreservada sometidas al proceso de regeneración mostraron evidencias macroscópicas de revascularización en la superficie externa y neoformación de tejido bien integrado en la superficie interna. No mostraban datos de necrosis (Figura 3).

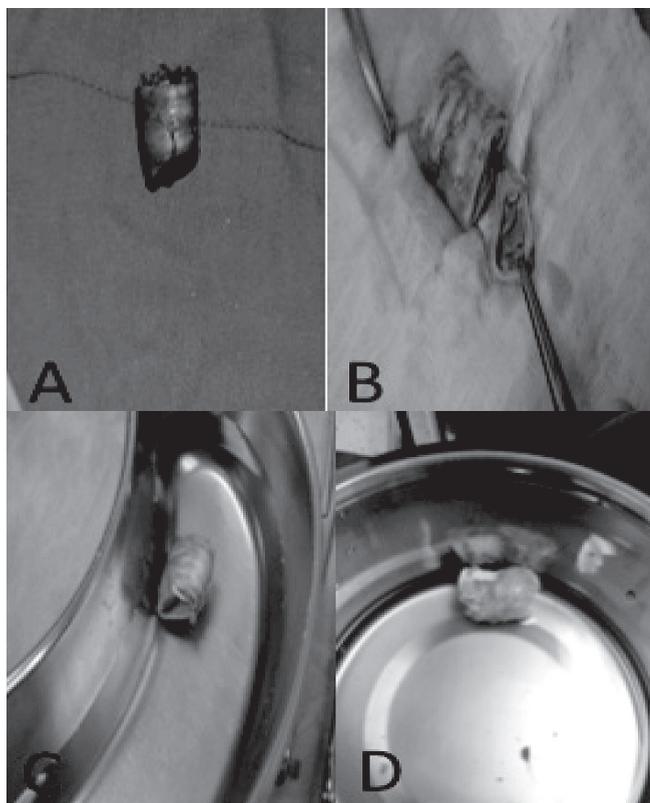


Figura 3. Evaluación morfológica del tejido traqueal regenerado (A) tráquea nativa (B) Matriz descelularizada con tritón, (C) Matriz descelularizada con desoxicolato, (D) Tráquea nativa criopreservada

No se presentaron datos de infección. Todas conservaron la luz con reducción en su diámetro ya que el espesor total de la pared era mayor al de una tráquea nativa (Figura 4).

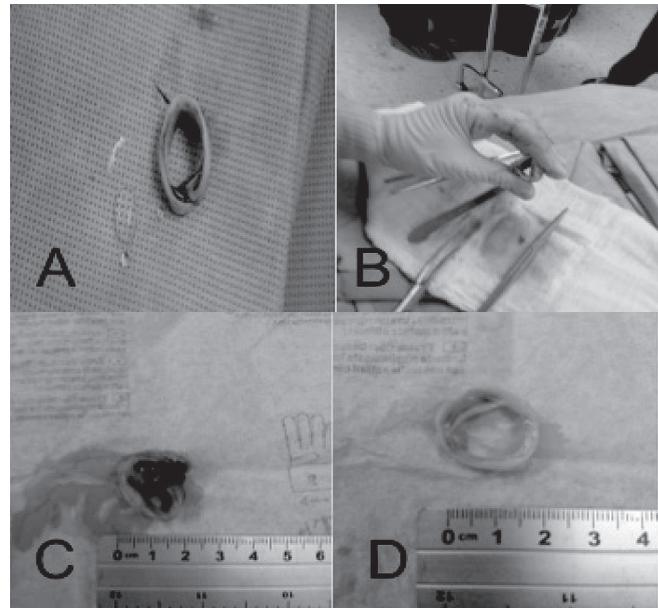


Figura 4. Evaluación de la luz traqueal en los tejidos regenerados (A) Tráquea nativa, (B) Matriz descelularizada con tritón, (C) Matriz descelularizada con desoxicolato, (D) Tráquea nativa criopreservada.

A la Evaluación de las propiedades mecánicas, la matriz después de 15 días de regeneración se deformaba fácilmente a la presión mecánica en comparación con las que permanecieron 8 días, las cuales demostraron ser más rígidas. Después de la compresión y flexión solo la tráquea nativa criopreservada volvía parcialmente a su forma original (Tabla 3).

Tráquea	Tiempo de regeneración	Rigidez (presión)	Flexibilidad (flexión)	Configuración (recuperación forma original)
Nativa	0	80%	140°	100%
Descelularizada Tritón	15 días	25%	30°	25%
Descelularizada Desoxicolato	8 días	30%	50°	50%
Nativa Criopreservada	8 días	50%	90°	75%

Tabla 3 Evaluación de las propiedades mecánicas del tejido regenerado.

La tráquea nativa representa los valores control. De acuerdo al tiempo de regeneración fueron evaluadas la rigidez, un valor menor de 80% indica que disminuyó. La flexibilidad es mayor al disminuir el ángulo y flexionar la tráquea (>140°). Si el tejido recupera su configuración original después de la presión el valor es del 100%.

DISCUSION

Los procesos para obtener las matrices fueron eficientes. La eliminación de células como el epitelio redujo su inmunogenicidad, conservándose microscópicamente la arquitectura del tejido y en la evaluación de las características mecánicas ambas presentaron similitud a la tráquea nativa.^{4,25} Se probó el método detergente enzimático ya que otros autores presentan evidencias de su utilidad para generar matrices que pueden estimular *in vivo* el crecimiento de células y la formación de matriz extracelular para la neoformación de tejido y ser utilizada como injerto.^{10,23,26}

Como resultado preliminar se logró la regeneración de los tejidos en el epiplón de los cerdos ya que aportaron los elementos indispensables para contener las matrices traqueales, como la interacción con células madre por ser un tejido adiposo y moléculas en un medio dinámico, controlable y reproducible así como esterilidad por estar protegido por el sistema inmunológico con ayuda del antibiótico sistémico administrado.^{27,28,29} Es un sistema hermético y permite el suministro de nutrientes, eliminación de desechos y apoya la actividad metabólica por su gran vascularización.^{9,30}

El tejido regenerado para cumplir con los requisitos de un injerto debe tener las características de rigidez, flexibilidad y vascularización parecidas a la tráquea nativa así como la presencia de epitelio respiratorio.⁹ Los tejidos que fueron regenerados presentaban aparentemente neoformación, integración y vascularización independientemente del tiempo que permanecieron en el biorreactor 15 u 8 días, sin embargo sus características mecánicas no eran adecuadas. Las alteraciones se debieron probablemente a un tratamiento drástico en la descelularización de las matrices, a la criopreservación o a la falta de fuerzas de tensión y cizallamiento durante el proceso.³¹ Es necesario un estudio histológico comparativo entre las matrices y los tejidos regenerados, resultados que se reportarán en una siguiente etapa, y en posteriores experimentos se tendrán que resolver los problemas que llevaron a las altera-

ciones en las características estructurales del tejido al proveer de las fuerzas de tensión y cizallamiento o reforzando las matrices antes de su regeneración.

REFERENCIAS

- Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1995–2004.
- Olmos-Zúñiga JR, Eguiza-Rubí V, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M, Santibáñez-Salgado JA, et al. Trasplante experimental de tráquea cervical combinado con la aplicación de factor de crecimiento de fibroblastos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2006; 19 (3)172-179.
- Birchall M, Macchiarini P. Airway transplantation: a debate worth having? *Transplantation* 2008; 85: 1075–80.
- Jungebluth P, Moll G, Baiguera S, Macchiarini P. Tissue-engineered airway: a regenerative solution. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91(1):81-93.
- Baiguera S, D’Innocenzo B, Macchiarini P. Current status of regenerative replacement of the airway. *Expert Rev Respir Med* 2011;5(4):487-94.
- Svenja H, Schenke-Layland K. Tracheal tissue engineering: building on a strong foundation. *Expert Rev Med Devices* 2013;10(1), 33–35.
- Elliott MJ, De Coppi P, Speggin S, Roebuck D, Butler CR, Samuel ES, et al. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet* 2012;380 (9846): 994–1000.
- Nakamura T, Ohmori K, Kanemaru S. Tissue-engineered airway and “in situ tissue engineering”. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2011;59(2):91-7.
- Zheng H, Hu X, Li C, Xie H, Gao W, Chen C. Re-epithelialization by epithelial inoculation with recipient phenotype in heterotopically transplanted rat allografts. *Chin Med J (Engl)* 2014;127(10):1913-8.
- Martinod E, Seguin A, Radu DM, Boddaert G, Chouahnia K, Fialaire-Legendre A, French Group for Airway Transplantation (FREGAT) et al. Airway transplantation: a challenge for regenerative medicine. *Eur J Med Res* 2013; 29:18-25.
- Neville WE, Bolanowski PJ, Kotia GG. Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99: 604.
- Demirbag B, Huri PY, Kose GT, Buyuksungur A, Hasirci V. Advanced cell therapies with and without scaffolds. *Biotechnol J* 2011; 6(12):1437-53.

- Conconi MT, De Coppi P, Di Liddo R, Vigolo S, Zanon GF, Parnigotto PP, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl Int* 2005; 18(6):727-34.
- Jungebluth P, Go T, Asnaghi A, Bellini S, Martorell J, Calore C, et al. Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138(3):586-593.
- Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells. Tissues. Organs* 2012;195(3): 222–231.
- Bayrak A, Tyralla M, Ladhoff J, Schleicher M, Stock UA, Volk HD, et al. Human immune responses to porcine xenogeneic matrices and their extracellular matrix constituents in vitro. *Biomaterials* 2010; 31(14): 3793–3803.
- Haykal S, Salna M, Zhou Y, Marcus P, Fatehi M, Frost G, et al. Double-chamber rotating bioreactor for dynamic perfusion cell seeding of large segment tracheal allografts: comparison to conventional static methods. *Tissue Eng Part C Methods* 2014; 20(8): 681–692.
- Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, Macchiarini P. Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet* 2012;379(9819): 943–952.
- Baiguera S, Birchall MA, Macchiarini P. Tissue-engineered tracheal transplantation. *Transplantation* 2010;89(5): 485–491.
- Peloso A, Dhal A, Zambon JP, Li P, Orlando G, Atala A, et al. Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6(1): 107.
- Hoyos Serrano M, Flores P, Lesly P. Tipos de Radiación, Aplicaciones, Beneficios y Riesgos. *Rev. Act. Clin. Med [online]* 2013; 37:1798-1803.
- Jones MC, Rueggeberg FA, Cunningham AJ, Faircloth HA, Jana T, Mettenburg D, et al. Biomechanical changes from long-term freezer storage and cellular reduction of tracheal scaffoldings. *Laryngoscope* 2015;125(1):16-22.
- Remlinger NT, Czajka CA, Juhas ME, Vorp DA, Stolz DB, Badylak SF, et al. Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction. *Biomaterials* 2010 ;31(13):3520-3526.
- Weidenecher M, Tucker HM, Awadallah A, Dennis JE. Fabrication of a neotrachea using engineered cartilage. *Laryngoscope* 2008; 118(4): 593-598.
- Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Matsumoto K, Sekine T, Ueda H, et al. Immunosuppressant free allotransplantation of the trachea: the antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:108–114.
- Hamilton N, Bullock AJ, Macneil S, Janes SM, Birchall M. Tissue engineering airway mucosa: a systematic review. *Laryngoscope* 2014;124(4):961-8.
- Lin CH, Hsu SH, Huang CE, Cheng WT, Su JM. A scaffold-bioreactor system for a tissue-engineered trachea. *Biomaterials* 2009;30:4117–4126.
- Jana T, Khabbaz E, Bush CM, Prosser JD, Birchall MA, Nichols CA et al. The body as a living bioreactor: a feasibility study of pedicle flaps for tracheal transplantation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013;270: 181–186.
- Jungebluth P, Bader A, Baiguera S, Möller S, Jaus M, Lim ML, et al. The concept of in vivo airway tissue engineering. *Biomaterials* 2012;33(17):4319-26.
- Delaere P, Vranckx J, Verleden G, De Leyn P, Van Raemdonck D, Leuven. Tracheal Transplant Group Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med* 2010; 362(2):138-45.
- Kajbafzadeh AM, Sabetkish S, Sabetkish N, Muhammadnejad S, Akbarzadeh A, Tavangar SM, et al. In-vivo trachea regeneration: fabrication of a tissue-engineered trachea in nude mice using the body as a natural bioreactor. *Surg Today* 2015; 45(8):1040-8.

REMISIÓN DE ARTÍCULO Y EL PROCESO EDITORIAL

Remitir el original por correo electrónico a

ciencia.frontera@uacj.mx

con atención al Comité Editorial.

En el texto del correo electrónico debe exponerse el título del artículo y los autores, en archivos anexos deben incluirse:

Datos de contacto de dos revisores que dictaminarán la calidad del trabajo, los revisores deben ser de una Institución diferente a la de los autores; las Facultades, escuelas, institutos ó centros de investigación de la misma universidad se considerarán como una misma institución; los diferentes departamentos de una empresa también se considerarán como pertenecientes a la misma institución, y por lo tanto no podrá incluirse a su personal como dictaminadores. Los datos de contacto son:

Nombre completo del revisor.

Adscripción: institución, dependencia, departamento, grupo de trabajo.

Correo electrónico.

Números de teléfono, y fax

Dirección con código postal.

El Comité Editorial acusará recibo del trabajo mediante correo electrónico. No se extienden oficios por la recepción del manuscrito. La recepción del manuscrito no garantiza su publicación.

Posteriormente a un tiempo de dictamen de un mes máximo, el Comité Editorial remite, vía correo electrónico, el trabajo a sus autores para que realicen las modificaciones que hubiera, con base en las acotaciones de los dictaminadores.

Los autores remitirán la segunda versión del manuscrito en un plazo máximo de 2 semanas y el Comité Editorial acusa recibo mediante correo electrónico. En caso de no recibir la versión corregida en este plazo, el comité se reserva el derecho de descartar la publicación y su posterior remisión se considerará como un nuevo proceso.

No se emitirán oficios por la recepción de los trabajos corregidos.

Posteriormente a la recepción del artículo en su versión definitiva, el Comité Editorial emite una acuse de recibo por correo electrónico y anunciará el proceso de revisión de galeras y publicación. Durante éste, el Comité Editorial trabaja en conjunto con la Subdirección de Publicaciones de la UACJ.

No se emiten oficios por cada artículo aceptado para publicación.

Cada fascículo se incluye en la página de publicaciones periódicas de la UACJ, bajo la dirección:

<http://www2.uacj.mx/Publicaciones/cienciaenlafrontera/default.htm>

La versión impresa de cada fascículo se procesa por la Subdirección General de Publicaciones.

Normas de publicación para los autores

El comité editorial de *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ*, recibe propuestas de artículos sobre tópicos de Ciencia en General para su publicación bajo dos modalidades: artículos de investigación y artículos síntesis de investigación (Revisiones). Las normas establecidas para la publicación son las siguientes:

1. Los trabajos deberán ser de calidad científica e inéditos.

2. Una vez publicado el artículo, los derechos de autor pasan a la UACJ.

3. Los artículos pueden ser artículos de investigación original y revisiones, los cuales deberán referirse a las áreas de ciencias naturales y exactas, ajustándose al dictamen del Comité Editorial, el que evalúa la calidad de su contenido científico y decide sobre la pertinencia de su publicación.

4. Los trabajos pueden ser enviados para su publicación en el idioma inglés o el español. Los artículos deberán incluir resumen en español seguido de uno en inglés (y viceversa).

5. Los trabajos deben ajustarse al siguiente formato:

Título del trabajo, breve y conciso, menor a 120 caracteres (incluyendo espacios).

Un resumen del contenido en español de 150 palabras como máximo, y un abstract en inglés.

Nombre de los autores.

Adscripción de todos los autores.

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.

Naturaleza del trabajo: artículo de investigación original, síntesis de información (Revisión).

Dirección para correspondencia que incluya: teléfono, fax y correo electrónico. El nom-

bre del autor al cual se dirigirá la correspondencia debe indicarse con un asterisco (*) y la leyenda "Autor para correspondencia".

Artículo de investigación original. Deberá constar de las siguientes secciones:

Introducción.

Método Experimental. En el caso de presentar experimentos con animales vivos, anexar aprobación del Comité De Bioética de la Institución de los autores *Resultados y Discusión.*

Conclusiones.

Bibliografía. Las referencias bibliográficas deben asentarse de la forma convencionalmente establecida en español, 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.

Distribuir los datos de las referencias bibliográficas de la siguiente manera:

Referencia de libro:

Apellidos, nombre del autor. Título del libro. Ciudad y País, Editorial. Número de páginas totales, año.

Ejemplo:

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

Referencia de capítulo libro:

Apellidos, nombre del autor. Título del capítulo. In: Apellido e iniciales del edi-

tor (ed.). Título del libro. Ciudad y País, Editorial. Páginas del capítulo, año.
Ejemplo:

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

Referencia de revista:

Apellido(s) del autor, inicial(es); otros autores. (año). "Título del artículo". *Nombre de la revista*, volumen, páginas. El título de la revista debe abreviarse según el Index Medicus journal abbreviations:

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

Ejemplos:

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

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

Artículo de Síntesis de Investigación (revisión)

Introducción.- Se sugiere exponer enfáticamente la relevancia del tema de la Revisión dentro de un área del conocimiento.

Desarrollo del tema y subtemas.

Perspectivas.- Analizar la síntesis expuesta con el planteamiento de los posibles descubrimientos ó desarrollos dentro del área, e implicaciones de índole terapéutica, industrial, o de impacto social.

Bibliografía. Conforme se ha expuesto para los artículos de investigación original.

El manuscrito debe remitirse en formato de "Word"; la tipografía Arial de 12 puntos, con 1.5 de espacio entre renglones. La extensión del trabajo deberá ser máximo de 30 cuartillas de texto.

Las ilustraciones, cuadros y fotografías, deberán referirse dentro del texto, enumerándose en el orden que se citan en el mismo, e indicar el programa de cómputo en el que están elaborados. Los cuadros deben separarse del texto del artículo y colocarse en un listado después de la bibliografía. Los pies de figura deberán ser explícitos sin necesidad de leer el texto principal, deberán incluirse en un listado después de los cuadros. Los archivos de fotografías e ilustraciones deben enviarse aparte, indicando el título del trabajo y la secuencia (Figura1, Figura 2, etc). Los archivos de figuras e ilustraciones deben ser menores a 2 MB.

Normas de publicación para los autores

El comité editorial de *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ*, recibe propuestas de artículos sobre tópicos de Ciencia en General para su publicación bajo dos modalidades: artículos de investigación y artículos síntesis de investigación (Revisiones). Las normas establecidas para la publicación son las siguientes:

1. Los trabajos deberán ser de calidad científica e inéditos.
2. Una vez publicado el artículo, los derechos de autor pasan a la UACJ.
3. Los artículos pueden ser artículos de investigación original y revisiones, los cuales deberán referirse a las áreas de ciencias naturales y exactas, ajustándose al dictamen del Comité Editorial, el que evalúa la calidad de su contenido científico y decide sobre la pertinencia de su publicación.
4. Los trabajos pueden ser enviados para su publicación en el idioma inglés o el español. Los artículos deberán incluir resumen en español seguido de uno en inglés (y viceversa).
5. Los trabajos deben ajustarse al siguiente formato:

Título del trabajo, breve y conciso, menor a 120 caracteres (incluyendo espacios).

Un resumen del contenido en español de 150 palabras como máximo, y un abstract en inglés.

Nombre de los autores.

Adscripción de todos los autores.

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.

Naturaleza del trabajo: artículo de investigación original, síntesis de información (Revisión).

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 (*) y la leyenda "Autor para correspondencia".

Artículo de investigación original. Deberá constar de las siguientes secciones:

Introducción.

Método Experimental. En el caso de presentar experimentos con animales vivos, anexar aprobación del Comité De Bioética de la Institución de los autores

Resultados y Discusión.

Conclusiones.

Bibliografía. Las referencias bibliográficas deben asentarse de la forma convencionalmente establecida en español, 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.

Distribuir los datos de las referencias bibliográficas de la siguiente manera:

Referencia de libro:

Apellidos, nombre del autor. Título del libro. Ciudad y País, Editorial. Número de páginas totales, año.

Ejemplo:

Foucalt, Michael. Las palabras y las cosas. México: Siglo XXI. Pp. 30-45. 1984.

Referencia de capítulo libro:

Apellidos, nombre del autor. Título del capítulo. In: Apellido e iniciales del editor (ed.). Título del libro. Ciudad y País, Editorial. Páginas del capítulo, año.

Ejemplo:

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

Referencia de revista:

Apellido(s) del autor, inicial(es); otros autores. (año). "Título del artículo". *Nombre de la revista*, volumen, páginas. El título de la revista debe abreviarse según el Index Medicus journal abbreviations:

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

Ejemplos:

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

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

Artículo de Síntesis de Investigación (revisión)

Introducción.- Se sugiere exponer enfáticamente la relevancia del tema de la Revisión dentro de un área del conocimiento.

Desarrollo del tema y subtemas.

Perspectivas.- Analizar la síntesis expuesta con el planteamiento de los posibles descubrimientos ó desarrollos dentro del área, e implicaciones de índole terapéutica, industrial, o de impacto social.

Bibliografía. Conforme se ha expuesto para los artículos de investigación original.

El manuscrito debe remitirse en formato de "Word"; la tipografía Arial de 12 puntos, con 1.5 de espacio entre renglones. La extensión del trabajo deberá ser máximo de 30 cuartillas de texto.

Las ilustraciones, cuadros y fotografías, deberán referirse dentro del texto, enumerándose en el orden que se citan en el mismo, e indicar el programa de cómputo en el que están elaborados. Los cuadros deben separarse del texto del artículo y colocarse en un listado después de la bibliografía. Los pies de figura deberán ser explícitos sin necesidad de leer el texto principal, deberán incluirse en un listado después de los cuadros. Los archivos de fotografías e ilustraciones deben enviarse aparte, indicando el título del trabajo y la secuencia (Figura 1, Figura 2, etc). Los archivos de figuras e ilustraciones deben ser menores a 2 MB.

REMISIÓN DE ARTÍCULO Y EL PROCESO EDITORIAL

Remitir el original por correo electrónico a

ciencia.frontera@uacj.mx

con atención al Comité Editorial.

En el texto del correo electrónico debe exponerse el título del artículo y los autores, en archivos anexos deben incluirse:

Datos de contacto de dos revisores que dictaminarán la calidad del trabajo, los revisores deben ser de una Institución diferente a la de los autores; las Facultades, escuelas, institutos ó centros de investigación de la misma universidad se considerarán como una misma institución; los diferentes departamentos de una empresa también se considerarán como pertenecientes a la misma institución, y por lo tanto no podrá incluirse a su personal como dictaminadores. Los datos de contacto son:

Nombre completo del revisor.

Adscripción: institución, dependencia, departamento, grupo de trabajo.

Correo electrónico.

Números de teléfono, y fax

Dirección con código postal.

El Comité Editorial acusará recibo del trabajo mediante correo electrónico. No se extienden oficios por la recepción del manuscrito. La recepción del manuscrito no garantiza su publicación.

Posteriormente a un tiempo de dictamen de un mes máximo, el Comité Editorial remite, vía correo electrónico, el trabajo a sus autores para que realicen las modificaciones que hubiera, con base en las acotaciones de los dictaminadores.

Los autores remitirán la segunda versión del manuscrito en un plazo máximo de 2 semanas y el Comité Editorial acusa recibo mediante correo electrónico. En caso de no recibir la versión corregida en este plazo, el comité se reserva el derecho de descartar la publicación y su posterior remisión se considerará como un nuevo proceso.

No se emitirán oficios por la recepción de los trabajos corregidos.

Posteriormente a la recepción del artículo en su versión definitiva, el Comité Editorial emite una acuse de recibo por correo electrónico y anunciará el proceso de revisión de galeras y publicación. Durante éste, el Comité Editorial trabaja en conjunto con la Subdirección de Publicaciones de la UACJ.

No se emiten oficios por cada artículo aceptado para publicación.

Cada fascículo se incluye en la página de publicaciones periódicas de la UACJ, bajo la dirección:

<http://www2.uacj.mx/Publicaciones/cienciaenlafrontera/default.htm>

La versión impresa de cada fascículo se procesa por la Subdirección General de Publicaciones.

